



Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Estudio de los mecanismos neuroprotectores  
frente a la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide en un  
modelo preclínico de la enfermedad de  
Alzheimer**

Silvia de Vidania Ballesteros

Madrid, 2019

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de los mecanismos neuroprotectores frente a la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide en un modelo preclínico de la enfermedad de Alzheimer**

Memoria presentada por **Silvia de Vidania Ballesteros**, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid. Tesis doctoral dirigida por el **Prof. Carlos Dotti** y el **Dr. Francesc Xavier Guix Rafols** y realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM).

El Prof. Carlos Dotti, Científico titular del CSIC, y el Dr. Francesc Xavier Rafols Guix, Doctor en Ciencias por la Universidad Pompeu Fabra,

CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación titulado: *Estudio de los mecanismos neuroprotectores frente a la toxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide en un modelo preclínico de la enfermedad de Alzheimer* ha sido realizado por Silvia de Vidania Ballesteros bajo su dirección y tutela, y que la memoria presentada reúne los requisitos de rigor científico, innovación y correcta aplicación metodológica para ser presentada y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares.

Madrid, 1 de marzo de 2019

Prof. Carlos Dotti

Dr. Francesc Xavier Rafols Guix

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores, del Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2014-068541).

# Índice

Resumen.....	I
Abstract .....	II
Clave de abreviaturas .....	III
1. Introducción .....	1
La enfermedad de Alzheimer .....	1
1.1.1. EA familiar y esporádica .....	1
1.1.2. Formación de $\beta$ amiloide.....	3
1.1.3. Agregación de A $\beta$ y degradación .....	5
1.1.4. Mecanismos de toxicidad de A $\beta$ .....	7
1.1.5. Contribución de tau a la EA .....	10
1.1.6. Modelos animales para la EA .....	11
1.1.7. App <sup>NL-F</sup> .....	14
1.1.8. Estrategias terapéuticas .....	14
Mecanismos de supervivencia en la enfermedad de Alzheimer.....	15
La neuroglobina .....	16
1.1.9. Expresión y localización.....	17
1.1.10. Funciones de la Ngb durante el estado fisiológico.....	17
1.1.11. La Ngb en patologías .....	19
1.1.12. Ngb y EA.....	20
2. Objetivos .....	22
3. Materiales y métodos.....	23
Sujetos experimentales .....	23
3.1.1. Ratones.....	23
3.1.2. Genotipado.....	23
3.1.3. Perfusión.....	24
Cultivos primarios de neuronas corticales .....	24
Técnicas comportamentales .....	25
3.1.4. Laberinto acuático de Morris .....	25
3.1.5. Condicionamiento al miedo .....	25
Registro de la actividad de campo ( <i>field recording</i> ).....	27
Técnicas bioquímicas.....	27
3.1.6. Procesamiento de cerebro (congelación, trizol, Paris kit).....	27
3.1.7. Procesamiento de cultivos celulares .....	27
3.1.8. Valoración de la concentración de proteínas.....	28

3.1.9.	Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot) .....	28
3.1.10.	PCR en tiempo real (qRT-PCR) .....	29
3.1.11.	Medida de especies reactivas de oxígeno (ROS) en rodajas de corteza .....	30
3.1.12.	Valoración de gránulos de lipofusina en rodajas de corteza .....	31
3.1.13.	Cuantificación de A $\beta$ (MesoScale) .....	31
3.1.14.	Tratamiento de neuronas con A $\beta$ soluble de App <sup>NL-F</sup> .....	32
3.1.15.	Tratamiento de neuronas con A $\beta$ <sub>42</sub> sintético .....	33
3.1.16.	Tratamiento de neuronas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33
3.1.17.	Toxicidad de los tratamientos (LDH) .....	33
3.1.18.	MTT .....	33
	Procedimientos histológicos .....	34
3.1.19.	Fijación y procesamiento de tejido (PFA, postfixation, vibratomo) .....	34
3.1.20.	Fijación de neuronas en cultivo .....	34
3.1.21.	Inmunofluorescencia en tejido (Iba1, GFAP, Neuroglobin, tGFP) .....	34
3.1.22.	Inmunofluorescencia de cultivos neuronales .....	35
3.1.23.	Detección de placas mediante tioflavina S .....	35
3.1.24.	Análisis de la arborización dendrítica .....	35
	Estudios con lentivirus .....	36
3.1.25.	Producción de lentivirus y titulación .....	36
3.1.26.	Infección de cultivos celulares .....	38
3.1.27.	Inyección de lentivirus en ratones App <sup>NL-F</sup> .....	38
	Análisis estadístico de los datos .....	39
4.	Resultados .....	40
	Los ratones App <sup>NL-F</sup> presentan algunos de los signos característicos de la enfermedad de Alzheimer .....	40
4.1.1.	Acumulación de especies tóxicas de A $\beta$ .....	40
4.1.1.	Neuroinflamación .....	41
4.1.2.	Estrés celular .....	43
4.1.3.	Fosforilación de tau .....	46
	Los ratones App <sup>NL-F</sup> no muestran alteraciones funcionales .....	46
4.1.4.	Plasticidad sináptica normal .....	47
4.1.5.	Ausencia de déficits de aprendizaje y pérdida de memoria .....	48
	La neuroglobina está sobreexpresada en el cortex de ratones App <sup>NL-F</sup> .....	50
4.1.6.	Análisis de genes de supervivencia .....	50
4.1.7.	Expresión de proteína .....	52

La acumulación de ROS en ratones App <sup>NL-F</sup> induce la expresión de Neuroglobina .....	53
4.1.1. El tratamiento de neuronas WT con A $\beta$ <sub>42</sub> sintético aumenta la expresión de Ngb mediante mecanismos dependientes de estrés oxidativo .....	53
4.1.1. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> incrementa los niveles de Ngb en neuronas WT .....	55
4.1.2. Acumulación de ROS en el cortex de ratones App <sup>NL-F</sup> .....	55
La Neuroglobina previene las alteraciones morfológicas neuronales inducidas por A $\beta$ .....	56
4.1.3. El silenciamiento de Ngb en ratones App <sup>NL-F</sup> produce alteraciones en la arborización dendrítica neuronal .....	57
4.1.4. La sobreexpresión de Ngb en neuronas WT en cultivo rescata los efectos tóxicos inducidos por A $\beta$ .....	60
4.1.1. La sobreexpresión de Ngb en neuronas WT en cultivo rescata las alteraciones mitocondriales inducidas por A $\beta$ o por ROS .....	63
5. Discusión .....	64
El ratón App <sup>NL-F</sup> como modelo de enfermedad de Alzheimer .....	64
Los App <sup>NL-F</sup> están protegidos .....	67
El estrés oxidativo inducido por A $\beta$ aumenta la expresión de Neuroglobina en los ratones App <sup>NL-F</sup> .....	68
La Neuroglobina como responsable de la prevención de la toxicidad inducida por A $\beta$ .....	70
6. Conclusiones .....	75
Bibliografía .....	77

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la primera causa de demencia, produce una pérdida progresiva de la memoria y del aprendizaje y afecta aproximadamente al 10% de la población envejecida. Una de las hipótesis más aceptadas propone que la enfermedad se desencadena a partir de la acumulación de péptido tóxico  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) en el cerebro, que produce neurotoxicidad mediante diversos mecanismos moleculares, entre los cuales el mejor establecido es la acumulación intracelular de tau en forma de ovillos, desembocando en último término en la degeneración neuronal. Sin embargo, el aumento de  $A\beta$  comienza al menos 10 años antes de la aparición de declive cognitivo, por lo que existe un periodo en el cual el cerebro es resistente a la toxicidad inducida por el péptido amiloide. En este trabajo hemos estudiado los mecanismos moleculares de protección frente a  $A\beta$  utilizando el ratón  $App^{NL-F}$  como modelo, ya que presenta un incremento de  $A\beta$  desde edades tempranas (3 meses) pero no manifiesta alteraciones cognitivas incluso después de 20 meses. El estudio de la expresión génica nos ha permitido descubrir que estos ratones presentan niveles elevados de la hemoproteína neuroglobina (Ngb) en la corteza cerebral, paralelamente con el incremento en  $A\beta$ . Nuestros datos bioquímicos en cultivos primarios de neuronas sugieren que  $A\beta$  es suficiente para inducir un aumento en los niveles de Ngb a través de un mecanismo dependiente de estrés oxidativo. Los estudios basados en la reducción de los niveles de Ngb *in vivo* en los ratones  $App^{NL-F}$  indican que esta proteína ejerce un papel importante en el mantenimiento de la arborización dendrítica, que es una de los primeros eventos que se alteran en el curso de la EA, tanto en modelos animales como en los humanos. Complementariamente, los ensayos *in vitro* en neuronas de ratones WT mostraron que la sobreexpresión de Ngb previene la desorganización del árbol dendrítico producida por  $A\beta$  exógeno. En conjunto, este trabajo pone de manifiesto uno de los mecanismos moleculares que el cerebro puede utilizar para resistir al efecto neurotóxico derivado de una producción elevada y sostenida en el tiempo de péptido amiloide.

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia and produces a progressive loss of learning and memory affecting around 10% of the aging population. One of the most accepted hypothesis proposes that the disease is triggered by the toxic accumulation of the amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) in the brain, which produces neurotoxicity through various molecular mechanisms, among which the best established is the intracellular accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs), which ultimately lead to neuronal degeneration. However, the increase in  $A\beta$  begins at least 10 years before the onset of cognitive decline, so there is a period in which the brain is resistant to the toxicity induced by the amyloid peptide. We have studied the molecular mechanisms of protection against  $A\beta$  using the  $App^{NL-F}$  mice as a model, since it presents pathological levels of  $A\beta$  from early adulthood (3 months) without demonstrating corresponding cognitive decline even at very advanced age (20 months old). The study of gene expression allowed us to discover that along with  $A\beta$  these mice also have high levels of the neuroglobin hemoprotein (Ngb) in the cerebral cortex. Our biochemical data on neuronal primary cultures suggest that  $A\beta$  is sufficient to induce an increase in Ngb levels through a mechanism dependent on oxidative stress. Studies based on the reduction of Ngb levels *in vivo* in  $App^{NL-F}$  mice indicate that this protein exerts an important role in the maintenance of dendritic arborization, one of the first events in the course of AD, both in animal models and in humans. Additionally, the *in vitro* assays in neurons of WT mice showed that the overexpression of Ngb prevents the disorganization of the dendritic branching produced by exogenous  $A\beta$ . Taken together, this work reveals a molecular mechanism that the brain can use to resist the neurotoxic effect derived from an elevated and sustained production of  $A\beta$  over time.



## Clave de abreviaturas

<b>aCSF:</b>	líquido cefalorraquídeo artificial
<b>APP:</b>	proteína precursora del amiloide
<b>A<math>\beta</math>:</b>	$\beta$ amiloide
<b>BSA:</b>	albúmina de suero bovino
<b>DHR:</b>	dihidrorrodamina
<b>DIV:</b>	días <i>in vitro</i>
<b>EA:</b>	enfermedad de Alzheimer
<b>Ip:</b>	intraperitoneal
<b>LTD:</b>	depresión a largo plazo
<b>LTP:</b>	pontenciación a largo plazo
<b>mGluR:</b>	receptor metabotrópico de glutamato
<b>NAC:</b>	N-acetil-cisteína
<b>nAChR:</b>	receptor nicotínico de acetilcolina
<b>NCT:</b>	nicastrina
<b>Ngb:</b>	neuroglobina
<b>NMDAR:</b>	receptor del ácido N-metil-D-aspartico
<b>NO:</b>	óxido nítrico
<b>OH<math>\cdot</math>:</b>	radical hidroxilo
<b>ONF:</b>	ovillos neurofibrilares
<b>ONOO<math>\cdot</math>:</b>	radical peroxinitrilo
<b>PB:</b>	tampón fosfato
<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA:</b>	paraformaldehido
<b>PHF:</b>	filamentos de pares helicoidales
<b>PSEN:</b>	presenilina
<b>RNS:</b>	especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS:</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>RT:</b>	temperatura ambiente ( <i>room temperature</i> )

**sAPP:** APP soluble

**Th-S:** tioflavina S

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

**LDH:** enzima lactato deshidrogenasa

# 1. Introducción

## La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, caracterizada clínicamente por una pérdida de la memoria y el aprendizaje. Además, los pacientes presentan alteraciones en el lenguaje (afasia), dificultad de reconocimiento visual (agnosia) y ejecución de tareas motoras (apraxia) (American Psychiatric Association 2013)

Histopatológicamente se caracteriza por la deposición extracelular de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), que se acumula y agrega formando estructuras denominadas placas seniles o placas amiloides. Su formación a partir de la proteína precursora del amiloide (APP) se explica con detalle más adelante. Además, la proteína tau, que naturalmente se encuentra estabilizando los microtúbulos, se hiperfosforila causando la acumulación de esta proteína en su estado fosforilado y formando ovillos neurofibrilares (ONF) intracelulares.

La deposición del  $A\beta$  comienza inicialmente en el neocórtex, para extenderse progresivamente hacia regiones allocorticales como el córtex entorrinal y el hipocampo, y finalmente alcanza áreas subcorticales. En cambio, el patrón de deposición de los ONF comienza en la corteza entorrinal e hipocampo y avanza hacia otras áreas corticales (Braak and Braak 1991; Thal et al. 2002).

Uno de los eventos más tempranos y que mejor correlaciona con el estado cognitivo del paciente, es la pérdida de sinapsis, probablemente debida a la presencia de oligómeros de  $A\beta$  (DeKosky and Scheff 1990). Asimismo, se puede observar distrofia de las neuritas, especialmente de aquellas más próximas a las placas amiloides. A partir de estadios más avanzados de la EA se produce una pérdida progresiva de las neuronas corticales, específicamente de las neuronas colinérgicas cuyo soma se encuentra en el núcleo basal de Meynert y proyectan hacia la corteza (Whitehouse et al. 1982).

### 1.1.1. EA familiar y esporádica

Atendiendo a la etiología de la enfermedad, se puede distinguir la EA familiar (o EA temprana) y la EA esporádica (también conocida como EA tardía).

*EA familiar*

Únicamente el 5% de los casos de pacientes con EA puede explicarse por mutaciones autosómicas dominantes. Si bien es cierto que se manifiesta antes que la EA esporádica, la edad exacta de aparición depende de la mutación, pudiendo variar desde los 43 y 50 años para mutaciones en PSEN1 y APP, hasta las formas más agresivas que aparecen entre los 26 y 30 años de edad (Ryan et al. 2016). En general, la EA familiar es mucho más agresiva que la forma esporádica y ocurre por mutaciones en 3 genes principalmente:

Gen de la proteína precursora del amiloide (APP): es una mutación rara, sin embargo, ha ayudado a comprender la patogénesis de la enfermedad. Las mutaciones en este gen pueden ocurrir dentro de la secuencia del A $\beta$ , incrementando la capacidad de este péptido para agregar y produciendo una angiopatía amiloide muy agresiva (Arctic: E693G (Nilsberth et al. 2001); Iowa: D649N (Grabowski et al. 2001)).

También se han descrito mutaciones adyacentes al sitio de corte de las enzimas secretasas, encargadas del procesamiento proteolítico del APP. Producen un aumento de los niveles totales de A $\beta$  en el caso de mutaciones en el sitio de corte de  $\beta$ -secretasa (*Swedish*: KM670/671NL (Mullan 1992)) o un aumento específico del fragmento A $\beta_{42}$  sobre el A $\beta_{40}$  en el caso de las  $\gamma$ -secretasas (*London*: V717L, V717G; *Indiana*: V717F; *Florida*: I716V; *Iberian*: I716F; (Eckman et al. 1997; Goate et al. 1991; Guerreiro et al. 2010; Murrell et al. 1991)).

Genes de la presenilina 1 (PSEN1) y 2 (PSEN2): codifican para subunidades del complejo  $\gamma$ -secretasa, de modo que las mutaciones en estos genes incrementan la proporción de A $\beta_{42}$  sobre A $\beta_{40}$ . PSEN1 es el gen mutado con más frecuencia en la EA, hasta la fecha se han descrito más de 175 mutaciones (Karch et al. 2014).

Aunque el porcentaje de EA familiar es muy pequeño, el estudio de las distintas mutaciones ha permitido comprender el mecanismo de formación del péptido A $\beta$  y desarrollar modelos animales para el estudio de la enfermedad.

#### *EA esporádica*

La gran mayoría (más del 95%) de pacientes con EA no presentan mutaciones en ninguno de los genes mencionados. Actualmente no existe consenso acerca de la etiología de este tipo de EA, sin embargo, se han determinado numerosos factores de riesgo.

La edad se considera el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EA, puesto que a partir de los 65 años la probabilidad de padecer la enfermedad se duplica, y a

partir de los 85 años aproximadamente el 30% de las personas desarrollan EA. Asimismo, la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (ApoE- $\epsilon 4$ ), constituye el principal factor de riesgo genético, ya que aumenta la producción de A $\beta$  y afecta a su degradación y eliminación del mismo del cerebro (Corder et al. 1993; Sharman et al. 2010; Verghese et al. 2013; Wisniewski et al. 1994). También se han encontrado correlaciones positivas entre otras circunstancias (diabetes tipo II, virus del herpes simple, daño cerebral traumático, ictus, etc) y la probabilidad para padecer EA (Masters et al. 2015). Es importante mencionar que estos factores de riesgo aumentan la probabilidad la EA, pero no determinan su aparición.

### 1.1.2. Formación de $\beta$ amiloide

De acuerdo con la hipótesis amiloide, la acumulación extracelular del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) es la principal causa de la enfermedad. Este argumento se apoya en la evidencia de que esta proteína es el principal componente de las placas seniles, estructuras presentes invariablemente en cerebros de pacientes con EA analizados *post-mortem* (Bloom 2014; Selkoe and Hardy 2016).

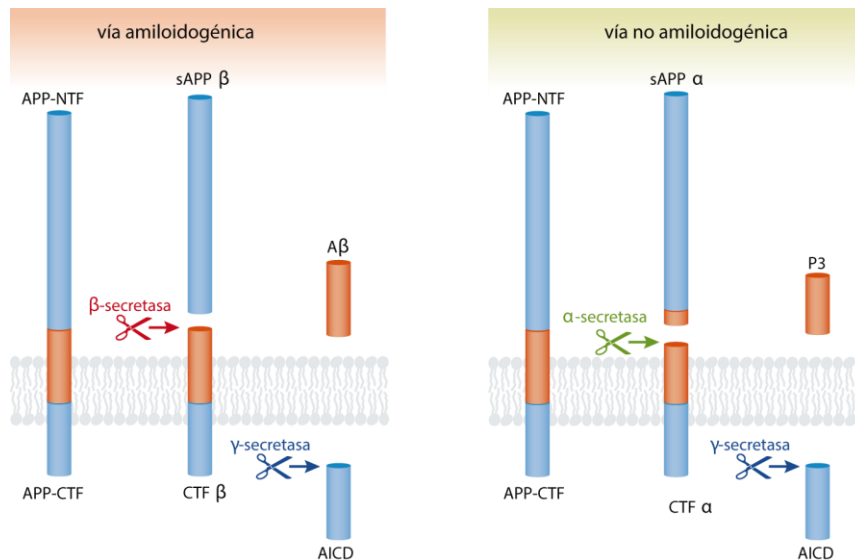
El A $\beta$  es el resultado de un proceso proteolítico muy complejo de la proteína precursora del amiloide (APP). El APP es una proteína integral de membrana que presenta un gran fragmento extracelular N-terminal y un dominio C-terminal más corto. Forma parte de una familia de proteínas cuyos otros dos miembros son las proteínas tipo APP (APLP) APLP1 y APLP2 (Coulson et al. 2000). El gen del APP se encuentra en el cromosoma 21 en humanos y da lugar a 3 isoformas mediante procesamiento alternativo: APP695, APP751 y APP770, con 695, 751 y 770 aminoácidos respectivamente. La isoforma más abundante en cerebro es la APP695, encontrándose principalmente en neuronas, y estructuralmente se diferencia de las otras dos porque no presenta el dominio inhibidor de la proteasa serínica de Kunitz (Guerreiro et al. 2012). Los estudios con ratones *knock-out* para APP sugieren que existe una cierta redundancia funcional entre las proteínas de esta familia, ya que estos animales son viables y fértiles, mostrando un fenotipo muy leve (Dawson et al. 1999; Zheng et al. 1995). Su función no está totalmente elucidada, sin embargo, se sugiere que desempeña un papel en funciones celulares importantes como el desarrollo neuronal, transducción de señales, transporte intracelular y otras funciones relacionadas con la homeostasis neuronal, como el metabolismo de calcio (Zheng and Koo 2006). Recientemente se ha demostrado el papel fisiológico de APP para regular la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal

mediante la unión de ciertos fragmentos secretados (sAPP) a receptores GABA<sub>B</sub>R1a (Rice et al. 2019).

El APP puede ser procesado mediante múltiples enzimas, originando fragmentos muy diversos y biológicamente activos. Su procesamiento proteolítico por la vía amiloidogénica da lugar al A $\beta$ .

*Vía amiloidogénica:* comienza por la acción de la  $\beta$ -secretasa 1 (BACE 1) y BACE2 (Vassar et al. 2014), que corta en el extremo N-terminal del A $\beta$  y origina un fragmento soluble sAPP $\beta$  y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (CTF $\beta$  o C99) anclado a membrana. Este fragmento es posteriormente internalizado y procesado por el complejo  $\gamma$ -secretasa, formado por 4 elementos: presenilinas 1 o 2 (PS1 o PS2) constituyendo el sitio catalítico, nicastrina (NCT), activador de PS 2 (PEN-2) y APh-1 (*anterior pharynx-defective-1*) (Kimberly et al. 2003; P. Lu et al. 2014a). El complejo  $\gamma$ -secretasa corta en el sitio  $\epsilon$  de CTF $\beta$  liberando el dominio intracelular APP (AICD), que puede traslocarse al núcleo y regular la expresión de una gran variedad de genes (Pardossi-Piquard et al. 2005), y continúa realizando cortes hacia el extremo N-terminal, dando lugar a péptidos A $\beta$  de 4 KDa (Tomita 2014). El fragmento de 40 aminoácidos (A $\beta$ <sub>40</sub>) es el más común, mientras que el A $\beta$ <sub>42</sub> se considera uno de los fragmentos más tóxicos. Además, se pueden producir otros fragmentos de distintos tamaños (A $\beta$ <sub>37</sub>, A $\beta$ <sub>38</sub>, A $\beta$ <sub>43</sub>, A $\beta$ <sub>45</sub>, A $\beta$ <sub>46</sub>, A $\beta$ <sub>48</sub>, A $\beta$ <sub>49</sub>), entre los cuales se puede destacar el A $\beta$ <sub>43</sub>, ya que se encuentra formando parte de las placas de amiloide en los pacientes con EA y es aún más tóxico que el A $\beta$ <sub>42</sub> (Saito et al. 2011; Welander et al. 2009); además, es la única especie de A $\beta$  producida por la mutación PSEN1 (L435F), que causa EA (Kretner et al. 2016). Asimismo, cabe mencionar el A $\beta$ <sub>38</sub> por su presencia en el cerebro de pacientes con EA y por su implicación neurotóxica relacionada con la homeostasis de calcio (Reinert et al. 2014).

*Vía no amiloidogénica:* es la forma fisiológicamente predominante de procesamiento del APP y se estimula con la actividad sináptica y neuronal (Hoey et al. 2009). La enzima  $\alpha$ -secretasa (principalmente la proteína con dominio metaloproteinasa y desintegrina 10: ADAM10) corta el APP dentro de la región de A $\beta$ , liberando un fragmento soluble sAPP $\alpha$  con importantes propiedades neuroprotectoras (Caille et al. 2004; Furukawa et al. 1996) y dejando el fragmento de 83 aminoácidos (CTF $\alpha$  o C83) (Prox et al. 2013). C83 es posteriormente procesado por el complejo  $\gamma$ -secretasa originando, además del fragmento AICD mencionado anteriormente, el fragmento P3 (Kahle and De Strooper 2003).



**Figura 1.1 Esquema del procesamiento de la proteína APP.** La imagen muestra las vías canónicas del procesamiento de APP. El péptido A $\beta$  se forma por el corte de APP mediante la vía amiloidogénica. Adaptado de Sasaguri et al., 2017.

*Vías no canónicas:* además de las vías canónicas descritas (amiloidogénica y no amiloidogénica), existen múltiples rutas no canónicas mediante las que el APP puede ser procesado. Por ejemplo, los fragmentos CTF pueden cortarse por caspasas y dar lugar al fragmento C31, que es neurotóxico y está involucrado en vías apoptóticas (Nhan et al. 2015). Recientemente se han descubierto vías que generan fragmentos N-terminales adicionales, como la vía  $\delta$ , la vía  $\eta$  y la vía de la meprina (Andrew et al. 2016). Algunos de estos productos proteolíticos están involucrados en la patogenia de la EA, sin embargo, se conoce poco acerca de la relevancia fisiológica de dichos fragmentos.

### 1.1.3. Agregación de A $\beta$ y degradación

Los péptidos A $\beta$  se generan y liberan en forma de monómeros, pero debido a sus propiedades químicas tienen una gran capacidad para agregarse en forma de oligómeros, protofibrillas y finalmente fibras amiloides, las formas más largas e insolubles que en último término se ensamblan y forman las placas amiloides.

La secuencia primaria de aminoácidos del péptido A $\beta$  se determinó en 1984 (Glenner and Wong 1984), y su estructura tridimensional se ha determinado empleando técnicas de resonancia magnética nuclear, dinámica molecular y cristalografía por rayos X.

El extremo C-terminal del péptido A $\beta$  determina su estado de agregación. El A $\beta_{40}$  es el péptido mayoritario en condiciones fisiológicas, y su conformación en  $\alpha$ -hélice le confiere

flexibilidad. Sin embargo, el A $\beta$ <sub>42</sub> tiene mucha mayor propensión a agregar debido a la rigidez que le confiere su extremo C-terminal en forma de horquilla  $\beta$  (Mirza et al. 2014).

#### *Oligómeros.*

Los monómeros pueden ensamblarse formando oligómeros de bajo peso molecular (dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros) o peso molecular medio (hexámeros, nonámeros y dodecámeros). Estas formas oligoméricas son solubles y pueden agregarse posteriormente formando protofibrillas y fibrillas, especialmente aquellos oligómeros de alto peso molecular (100-200 KDa) (G. F. Chen et al. 2017).

Estos oligómeros presentan una estructura en lámina  $\beta$  de carácter paralelo o antiparalelo (Yu et al. 2009). Tienen una apariencia esférica que más tarde se elonga por coalescencia de varias subunidades y forma la estructura precursora de las protofibrillas y las futuras fibras maduras.

#### *Fibrillas*

Las fibras de A $\beta$  son el resultado de la agregación de cadenas de polipéptidos A $\beta$  formando una estructura en lámina  $\beta$ . Estas estructuras presentan un patrón mayoritariamente en sentido paralelo, pero ciertos segmentos peptídicos cortos pueden adoptar una conformación antiparalela (Petkova et al. 2004).

La diferencia de 2 aminoácidos entre los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> tiene enormes consecuencias biofísicas y clínicas. La estructura tridimensional de los residuos 15-42 de A $\beta$ <sub>42</sub> forma una estructura muy particular (lámina  $\beta$  cruzada en forma de doble herradura) que, por sus condiciones físicas, constituye la especie más neurotóxica y con mayor capacidad de agregación. El A $\beta$ <sub>40</sub> es el fragmento más abundante en las placas amiloides de los enfermos de Alzheimer, mientras que el A $\beta$ <sub>42</sub> se encuentra formando el *core* de estas estructuras. (G. F. Chen et al. 2017).

Los déficits cognitivos, no obstante, comienzan antes de la deposición de placas o de la detección de fibrillas amiloides insolubles. La cantidad de A $\beta$  en forma de oligómeros, sin embargo, es muy elevada en cerebros de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad (Hardy and Selkoe 2002; Klein et al. 2001). Por lo tanto, actualmente se considera que son los oligómeros las formas más tóxicas para la célula y los principales responsables del desarrollo de la patología (Walsh et al. 2002).



#### 1.1.4. Mecanismos de toxicidad de A $\beta$

##### *Disrupción de la estructura de membrana*

Los oligómeros de A $\beta$  tienen la capacidad de unirse a la membrana lipídica y modificar su estructura, llegando a inducir la formación de poros en la membrana celular de las neuronas. Esto afecta no solo a las propiedades intrínsecas de conductancia que posee la membrana, sino a las proteínas involucradas en la transmisión sináptica como los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. De esta forma se produce un influjo anormal de iones Ca<sup>2+</sup> que produce un desequilibrio iónico y altera la función de la mitocondria, teniendo consecuencias tóxicas para la neurona (Kandel et al. 2017; MacManus et al. 2000; Prangkio et al. 2012). Se ha propuesto que dentro de la categoría de oligómeros, son los de mediano tamaño (de 16 a 24-meros) los responsables de la formación de poros (Jang et al. 2009).

##### *Inflamación*

La neuroinflamación de los enfermos de Alzheimer se ha demostrado no solo mediante estudios histopatológicos *post mortem*, sino por la presencia de mediadores inflamatorios (quimioquinas, citoquinas, factores del complemento, etc.) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes (Heneka et al. 2015). Mediante técnicas de tomografía por emisión de positrones (PET) se pueden visualizar en el cerebro de pacientes con EA ligandos (como el PK11195) que se unen a células microgliales activas. Este tipo de estudios han permitido conocer que la neuroinflamación es un evento muy temprano, anterior a la deposición de A $\beta$ , presente en pacientes con alteración cognitiva leve (estadio temprano de la EA) (Cagnin et al. 2001). Además de estas evidencias, numerosos estudios epidemiológicos han relacionado un consumo prolongado de antiinflamatorios no esteroideos con una menor prevalencia de la enfermedad (Sastre et al. 2003). Sin embargo, aunque clásicamente se ha descrito la neuroinflamación como una característica más de la enfermedad, no ha sido hasta hace unos años cuando se ha empezado a comprender la contribución de esta reacción inmunológica al desarrollo y pronóstico de la enfermedad.

Los oligómeros inducen la reacción inflamatoria mediante su unión a diversos receptores presentes en la microglía. Por ejemplo, activan receptores de la familia tipo Toll (TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9) y sus co-receptores (CD36, CD14, CD47), así como los receptores de productos finales de glicación avanzada (RAGE), conduciendo a la activación de vías proinflamatorias (S. Liu et al. 2012b; Walker and Jucker 2015).

La unión del A $\beta$  a estos receptores, desencadena la formación de citoquinas proinflamatorias de la familia IL-1 $\beta$  en su forma inactiva. La muerte celular y la acumulación de mediadores inflamatorios que ocurre durante la enfermedad, potencian la activación de estas células, induciendo la formación del inflamasoma. Este complejo molecular corta las citoquinas proinflamatorias en su forma activa, las cuales se liberan y desencadenan una reacción inflamatoria en las células circundantes (Halle et al. 2008; Latz et al. 2013; Ransohoff 2017).

Si bien es cierto que la reacción inflamatoria aguda es beneficiosa bajo ciertas circunstancias, la activación microglial sostenida que tiene lugar durante la EA deja de ser beneficiosa. Se ha demostrado en ratones modelo para la EA que una deficiencia en la formación del inflamasoma protege a estos animales de la enfermedad (Halle et al. 2008). La inflamación crónica produce una pérdida de las funciones fagocíticas y resolutivas de la microglía, que se mantiene en su fenotipo proinflamatorio y contribuye al empeoramiento de las funciones cognitivas (Heneka et al. 2015).

#### *Disfunción sináptica*

El efecto neurotóxico del A $\beta$  sobre la sinapsis se refleja en la pérdida de marcadores sinápticos, densidad de espinas dendríticas y alteraciones en la plasticidad sináptica. La pérdida sináptica es uno de los signos de la EA que mejor correlaciona con el declive cognitivo de los pacientes (DeKosky and Scheff 1990; Terry et al. 1991), por lo tanto, debe considerarse como uno de los eventos más críticos en el desarrollo de la fisiopatología. Se ha observado una pérdida de alrededor del 30% de las sinapsis en cada una de las neuronas corticales cuando la enfermedad ya ha sido diagnosticada (Terry et al. 1991).

Los oligómeros de A $\beta$  son capaces de activar diversos receptores involucrados en la transmisión sináptica, principalmente aquellos que se encuentran en la región postsináptica. El A $\beta$  interacciona con los receptores glutamatérgicos NMDAR (receptor del ácido N-metil-D-aspartico) y mGluR (receptor metabotrópico de glutamato) y otros como el receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR) y NL-1 (receptor de neuroleuquina), cuya activación prolongada induce sinaptotoxicidad (Dinamarca et al. 2012).

La regulación de la actividad sináptica mediada por A $\beta$  es compleja y depende en gran medida de las concentraciones del péptido en el espacio extracelular. A concentraciones óptimas (rango pM) el A $\beta$  potencia la transmisión sináptica por mecanismos que involucran

a los nAChR, sugiriendo que este mecanismo es dependiente de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal presináptico (Dineley et al. 2002; Puzzo et al. 2008; Wei et al. 2010).

Sin embargo, concentraciones por encima del rango fisiológico impiden una correcta transmisión sináptica (Abramov et al. 2009). El  $\text{A}\beta$  produce una activación inicial de los NMDAR que, junto con el aumento de los niveles de glutamato inducidos por la presencia de  $\text{A}\beta$  en las sinapsis, conduce a la desensibilización de estos receptores y a su internalización. De esta manera se activan los mecanismos responsables de la facilitación de la depresión a largo plazo (LTD) (Kullmann and Lamsa 2007; Palop and Mucke 2010; Q. Wang et al. 2004). Además, se produce la activación perisináptica de  $\alpha 7$ -nAChR, mGluR y NMDAR, mecanismos moleculares implicados en la facilitación de LTD por parte del  $\text{A}\beta$  (Hsieh et al. 2006; S. Li et al. 2009).

Los mecanismos moleculares responsables de la facilitación de LTD están relacionados con la disminución de la potenciación a largo plazo (LTP) inducida por  $\text{A}\beta$ . El bloqueo de las cascadas moleculares relacionadas con LTD (rutas mediadas por mGluR, por ejemplo) previene la inhibición de LTP dependiente de  $\text{A}\beta$  (Q. Wang et al. 2004).

Además, la alteración de la transmisión sináptica conduce a la generación de patrones actividad neuronal aberrantes, lo cual explica la actividad epiléptica que se ha observado en pacientes (Palop and Mucke 2009). Asimismo, se ha descrito actividad epileptiforme en ciertos modelos animales (Palop et al. 2007).

#### *Estrés oxidativo*

El estrés oxidativo es un evento temprano en la EA y es directamente proporcional a la cantidad de  $\text{A}\beta$  en el cerebro (Sultana et al. 2006).

Las especies reactivas de oxígenos (ROS) y de nitrógeno (RNS) desempeñan funciones fisiológicas y son necesarias para un correcto funcionamiento celular. Sin embargo, cuando se rompe el equilibrio entre estas especies reactivas y los mecanismos antioxidantes de la célula, los ROS y RNS se acumulan, dañando las biomoléculas y alterando el funcionamiento celular. Entre estas especies encontramos el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), óxido nítrico (NO) y peroxinitrilo ( $\text{ONOO}^-$ ) (Swomley et al. 2014).

Los oligómeros de A $\beta$  son capaces de inducir la formación de ROS en neuronas (Harris 1995 Exp neurol, Hensley 1994 PNAS, Butterfield 2005 Neurobiol ageing), especialmente cuando se encuentran formando complejos con metales como Fe o Cu, que son capaces de reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir  $\cdot$ OH (Guilloureau et al. 2007).

Los ROS y RNS producidos por A $\beta$  generan daño celular a varios niveles. En primer lugar, alteran la integridad de la membrana lipídica ya que producen la peroxidación de los lípidos que la componen. La peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados origina especies reactivas como el HNE (malondialdehído, 4-hidroxi-2-trans-nonenal), con capacidad para alterar otras biomoléculas. Por ejemplo, HNE incrementa la actividad de la  $\gamma$ -secretasa por la modificación de su componente NCT (Gwon et al. 2012).

La función de las proteínas también se altera por la acción de los ROS y RNS. Por ejemplo, la modificación de proteínas implicadas en la glucólisis conduce a una disminución del metabolismo energético (Tramutola et al. 2017). De manera recíproca, la disminución de ATP que tiene lugar aumenta la producción de ROS en la mitocondria, generando así una nueva fuente de producción de especies reactivas (Aluise et al. 2011). El propio A $\beta$  también sufre nitración, lo que aumenta su capacidad de agregación *in vitro* (Guivernau et al. 2016) e *in vivo* (Kummer et al. 2011).

Por último, las modificaciones oxidativas de los ácidos nucleicos inducidas por ROS y RNS bloquean la capacidad de reparación del ADN y producen pequeñas rupturas en las cadenas de nucleótidos, lo cual contribuye a la neurodegeneración (Cheignon et al. 2018)

#### **1.1.5. Contribución de tau a la EA**

La proteína tau está codificada por el gen MAPT, cuyo procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10 da lugar a las 6 isoformas presentes en el cerebro. Existen enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías, como la demencia frontotemporal (DFT), asociadas a mutaciones en el gen MAPT (Hong et al. 1998).

La principal función de tau es estabilizar los microtúbulos mediante su dominio de unión en el extremo C-terminal. Sin embargo, de manera muy interesante, se ha demostrado que este dominio no interacciona únicamente con microtúbulos, sino también con otras proteínas de relevancia para la EA, como la PSEN1 (Ballatore et al. 2007).

La proteína puede ser fosforilada en cualquiera de sus 84 sitios de fosforilación (45 serinas, 35 treoninas y 4 tirosinas), sin embargo, la fosforilación más común asociada a la EA

ocurre en los residuos Ser202/Thr205. Tau se encuentra unida a los microtúbulos en un estado de equilibrio que depende de su estado de fosforilación, el cual viene determinado por la acción de diferentes quinasas y fosfatasas (L. M. Ittner et al. 2010; Neddens et al. 2018).

En su estado hiperfosforilado, tau se desprende de los microtúbulos, lo cual afecta a la estabilización de los mismos y al transporte axonal (L. M. Ittner et al. 2010). Además, la separación de tau de los microtúbulos produce un aumento de los niveles de tau libre en el citosol, incrementando la probabilidad de que ocurran cambios conformacionales y su tendencia a agregar. En los primeros estadios, la proteína agrega formando estructuras (pre-ovillos) que no tienen la conformación en lámina  $\beta$ . Más adelante, aparecen agregados con estructura en lámina  $\beta$  denominados filamentos de pares helicoidales (PHF), los cuales pueden ensamblarse para dar lugar a los ONF (Ballatore et al. 2007). Durante el proceso de estrés oxidativo que tiene lugar en la EA, los ROS y RNS tienen la capacidad de modificar la proteína y afectar a su función fisiológica. Por ejemplo, la nitración de tau favorece la capacidad de agregación de esta proteína y promueve la formación de los ONF (Q. Liu et al. 2005).

La pérdida de la función fisiológica de tau y su agregación en ONF colaboran, mediante múltiples mecanismos, al proceso neurodegenerativo que tiene lugar durante la EA.

Por un lado, la desestabilización de microtúbulos conduce a alteraciones del citoesqueleto, compromete el transporte axonal y contribuye a la disfunción sináptica. Por otro lado, la acumulación intracelular de los ONF colabora a alterar el transporte axonal debido a su tamaño y a sus propiedades físicas, favoreciendo la unión de otras proteínas a estas estructuras de agregación. Por último, los agregados de tau en su estado hiperfosforilado son capaces de activar las células gliales y exacerbar así la neuroinflamación que tiene lugar durante la enfermedad y que colabora al proceso de neurodegeneración (Ballatore et al. 2007; L. M. Ittner et al. 2010; Laurent et al. 2018).

#### **1.1.6. Modelos animales para la EA**

La gran mayoría de los conocimientos que tenemos acerca de los eventos que tienen lugar durante la enfermedad ha sido posible gracias a los modelos animales para la EA, a preparaciones de rodajas de cerebro o cultivos de sus células neurales.

## A. Ratones de primera generación

Hasta la fecha, la gran mayoría de modelos animales con los que se ha trabajado para estudiar la EA han sido ratones transgénicos (ratones de primera generación), en cuyo genoma se ha insertado una o múltiples copias de un gen mutado (transgén).

El transgén más comúnmente utilizado ha sido el APP humano con la mutación *Swedish* (KM670/671NL), expresado bajo diversos promotores (el factor de crecimiento  $\beta$  derivado de plaquetas PDGF- $\beta$ ; la proteína priónica PrP; Thy1). Algunos de los modelos más usados dentro de esta categoría incluyen el Tg2576 (Hsiao et al. 1996) y APP23 (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Estos ratones sobreexpresan APP y producen A $\beta$  en gran cantidad, que agrega y se acumula en placas parecidas a las de pacientes con EA. También presentan alteraciones cognitivas antes de la deposición de placas. Sin embargo, estos modelos no tienen pérdida neuronal ni forman ONF.

También se ha empleado el gen PSEN1 mutado que, a pesar de ser la mutación más frecuente en la EA, no es capaz de inducir patología amiloide en el ratón. Esto es debido, probablemente, al bajo potencial amiloidogénico del A $\beta$  murino, cuya secuencia solo difiere en 3 aminoácidos con el A $\beta$  humano (Duff et al. 1996; Schneider et al. 2001). Sin embargo, los ratones con la doble mutación (PSEN1 y APP) como el ratón APPPS1 (APP KM670/671NL y PSEN1 L166P) presentan deposición amiloide, déficits de memoria y pérdida neuronal (Radde et al. 2006). Existe un modelo de ratón, el 5XFAD, que posee 5 mutaciones en los transgenes APP y PSEN1 (APP KM670/671NL, I716V, V717I; PSEN1 M146L, L286V) y desarrolla una amiloidogénesis temprana y más agresiva, así como una gliosis prominente (Oakley et al. 2006).

Para intentar replicar los ONF que presentan los pacientes, también se han empleado mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau (MAPT), que producen alteraciones en el ensamblaje de microtúbulos y aumentan la tendencia a agregar de esta proteína. Por ejemplo, el ratón 3xTg (APP KM670/671NL; MAPT P301L; PSEN1 M146V) presenta ONF, gliosis, placas amiloides, alteraciones sinápticas y déficits de memoria (Oddo et al. 2003). Sin embargo, las mutaciones en el gen MAPT no causan EA sino que están relacionadas con diferentes tauopatías como la enfermedad de Pick o la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17.

Los ratones de primera generación, si bien no consiguen reproducir todos los síntomas de la EA, han resultado muy útiles para estudiar los mecanismos de producción y deposición del A $\beta$ , así como para desarrollar fármacos encaminados a reducir la acumulación de este péptido. Ensayos con inhibidores de la  $\beta$ -secretasa y con inmunoterapia pasiva frente a A $\beta$  han sido satisfactoriamente trasladados a humanos y se encuentran actualmente en fase III. Sin embargo, este tipo de modelo presenta importantes inconvenientes. Por ejemplo, es difícil distinguir el efecto debido a la sobreproducción del péptido A $\beta$  de la sobreexpresión del APP que, como se ha comentado anteriormente, se procesa en numerosos fragmentos biológicamente activos. Asimismo, la inserción aleatoria del transgén en el genoma del ratón puede dar lugar a otras mutaciones y alterar la expresión de genes endógenos. Además, algunos de ellos resultan demasiado artificiales o presentan mutaciones no relacionadas con la EA (mutaciones en el gen MAPT) (Sasaguri et al. 2017).

#### B. Ratones de segunda generación

Para solucionar las desventajas derivadas de la sobreexpresión de APP, los ratones de segunda generación mantienen su estructura genómica a excepción de las mutaciones que se introducen mediante estrategia *knock-in*.

En todos los ratones *knock-in*, la secuencia del A $\beta$  se ha humanizado cambiando 3 aminoácidos para incrementar su capacidad de agregación. Los ratones App<sup>NL</sup> presentan la mutación *Swedish* en el APP murino, sin embargo, no desarrollan amiloidosis ni tienen déficits cognitivos (Saito et al. 2014; Salas et al. 2018). Cuando se introducen, además, otras mutaciones del APP como la *Iberian* (App<sup>NL-F</sup>) o la *Arctic* (App<sup>NL-G-F</sup>), estos ratones reproducen muchas características de la EA: presentan sobreproducción de A $\beta$  y agregación en placas amiloides, neuroinflamación y alteraciones cognitivas, siendo todos estos signos más precoces y acusados en los ratones App<sup>NL-G-F</sup> (Saito et al. 2014). Por su relevancia en esta tesis doctoral, el fenotipo del modelo App<sup>NL-F</sup> se desarrolla en profundidad en el siguiente apartado.

Se ha generado también un ratón *knock-in* con múltiples mutaciones en el APP: el modelo APP DSL (K670N, M671L, E693Q), que incluye una mutación (*Dutch*: E693Q) que no causa la EA sino que está relacionada con la angiopatía cerebral amiloide (H. Li et al. 2014). Estos ratones presentan una deposición mínima de A $\beta$

Los modelos murinos para la EA de segunda generación no presentan ONF ni tienen pérdida neuronal, como ocurre en pacientes. Ningún modelo es capaz de reproducir el vasto espectro patológico de la EA.

#### 1.1.7. **App<sup>NL-F</sup>**

Este modelo de ratón para la EA se ha generado mediante estrategia *knock-in*, como se ha comentado anteriormente, de manera que se mantiene el genoma del ratón intacto a excepción de las mutaciones necesarias para humanizar la secuencia del A $\beta$  (G676R, F681Y y H684R), y las mutaciones en el gen APP. Este ratón presenta las mutaciones *Swedish* e *Iberian*, que en conjunto generan una sobreproducción del péptido A $\beta$ , específicamente del fragmento A $\beta$ <sub>42</sub> sobre el A $\beta$ <sub>40</sub>, manteniendo niveles fisiológicos de APP. Consecuentemente, se pueden observar placas amiloides que comienzan en el cortex a los 9 meses de edad y se van extendiendo progresivamente hasta alcanzar el hipocampo. Alrededor de las placas se puede observar activación microglial y astrocitaria, así como pérdida de marcadores sinápticos.

Los autores describen una ligera pérdida de memoria en animales de 18 meses de edad, medida en el laberinto en forma de Y, en el cual los ratones App<sup>NL-F</sup> muestran una menos alternancia de exploración entre los diferentes brazos del laberinto.

Al igual que muchos otros modelos para la EA, estos ratones no presentan muerte neuronal ni ONF.

#### 1.1.8. **Estrategias terapéuticas**

Actualmente existen 5 fármacos aprobados y en uso, dirigidos a mejorar los síntomas mediante dos mecanismos de acción principalmente. Por un lado, los inhibidores de la enzima colinesterasa restauran los niveles de la acetilcolina, neurotransmisor cuyos niveles disminuyen dramáticamente durante la EA. Esta categoría de fármacos incluye donepezilo, rivastagmina, galantamina y tacrina (Bryson and Benfield 1997; Rogers and Friedhoff 1996; Woodruff-Pak et al. 2007). Por otro lado, la memantina bloquea el receptor de NMDA y reduce la actividad de glutamato, neurotransmisor fundamental en el aprendizaje y memoria pero que sin embargo debido a que la unión a receptores lleva a un flujo prolongado de iones Ca<sup>2+</sup> y contribuye a la excitotoxicidad por glutamato (Riepe 2005).



Cabe destacar que existe un tratamiento de inmunoterapia pasiva (aducanumab) que ha demostrado tener eficacia reduciendo el déficit cognitivo en pacientes y que actualmente se encuentra en fase III de desarrollo (Sevigny et al. 2016).

## **Mecanismos de supervivencia en la enfermedad de Alzheimer**

La existencia de un periodo de tiempo prolongado, que puede ser superior a 10 años, desde la acumulación de estímulos tóxicos (acumulación de A $\beta$ , ONF, inflamación) y la aparición de declive cognitivo, además de la ausencia de fenotipo en los modelos de segunda generación, sugieren la existencia de mecanismos de defensa contra dichos insultos.

La supervivencia celular es especialmente crítica para las neuronas maduras, puesto que son células postmitóticas con una reducida capacidad de regeneración, que deben formar parte del circuito neuronal durante toda la vida del individuo. Por este motivo, las neuronas maduras han desarrollado mecanismos moleculares, a menudo redundantes, para asegurar su supervivencia ante los insultos que puedan comprometer su viabilidad (excitotoxicidad, infecciones, hipoxia, etc.) (Kole et al. 2013).

Existen múltiples mecanismos moleculares que protegen a las neuronas de la muerte celular. Por ejemplo, la inhibición de la vía apoptótica mediante la fosforilación de diferentes quinasas (JNK, PI3K), la expresión de proteínas implicadas en la salida de citocromo c de la mitocondria (Bcl-2, Bax) o en la formación del apoptosoma (Apaf-1, Casp-9), etc (Kole et al. 2013; Perluigi et al. 2016; Yakovlev et al. 2001).

La pérdida de los mecanismos de supervivencia neuronal podría crear un ambiente más permisivo para la muerte celular en condiciones de estrés y toxicidad elevados, como ocurre durante el proceso de neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer. De hecho, en pacientes con EA se ha reportado la represión de genes implicados en la activación de las vías de supervivencia mencionadas, tales como GRN (progranulina), PIN1 (peptidilpropil cis/trans isomerasa), BLVRA (biliverdina reductasa A) o NGB (neuroglobina) (Barone et al. 2011; Driver and Lu 2010; Sleegers et al. 2010; Szymanski et al. 2010). Consistentemente, existe una asociación entre la regulación al alza de genes que activan mecanismos de protección celular y una disminución en la incidencia de la enfermedad. Algunos ejemplos de estos genes son FOXO3 (*forkhead box O*), QPCT (glutaminil péptido ciclotransferasa) o TMEM106b (proteína de transmembrana 106 b) (Harris et al. 2007; Morawski et al. 2014; Serpente et al. 2015; Wong et al. 2013).

Por su relevancia en esta tesis, la neuroglobina (Ngb) se desarrolla en detalle a continuación.

## La neuroglobina

La neuroglobina (Ngb) se describió por primera vez en el año 2000 en el cerebro de humano y ratón (Burmester et al. 2000).

Forma parte de la familia de las hemoproteínas, junto con la hemoglobina (Hb), mioglobina (Mb) o la citoglobina (Cyb). Presenta una estructura globular clásica, formada por 8 segmentos en  $\alpha$ -hélice (A-H) que envuelven el grupo prostético y se encuentran organizados en 2 capas (estructura conocida como sándwich  $\alpha$ -helicoidal 3/3) (Pesce et al. 2003; Vallone et al. 2004). El átomo de Fe con capacidad para unir  $O_2$  (grupo hemo) está coordinado por 6 grupos (hexacoordinado), a diferencia del resto de globinas que están pentacoordinadas: 4 átomos pirrólicos de N en el plano hemo, y dos residuos de His: His(E7)64 distal e His(F8)96 proximal (Guimaraes et al. 2014; Pesce et al. 2003; Vallone et al. 2004).

El gen de la Ngb humana se encuentra en el brazo largo del cromosoma 14, en la posición q24.3. Está altamente conservado en mamíferos y se compone de 4 exones y 3 intrones (B12.2, E11.0 y G7.0) (Burmester et al. 2000). La región promotora de la Ngb está bien conservada entre humanos y roedores y presenta los siguientes sitios de unión para diversos factores de transcripción, que regulan la expresión basal de Ngb: la proteína CREB (*cAMP response element binding*), miembros de la familia de NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ -light chain enhancer of activated B cells*) como p50, p65 y cRel y proteínas de la familia de proteínas Sp (*specificity proteins*) como Sp1 (Haines et al. 2012; N. Liu et al. 2012a; N. Liu et al. 2013; C. G. Zhang et al. 2001). En condiciones de hipoxia, es necesaria la acción del factor inducible por hipoxia (HIF-1), además de NF- $\kappa$ B y Sp1. Sin embargo, no se ha identificado una secuencia de unión de HIF-1 al promotor de la Ngb, de manera que se ha propuesto que dicha proteína actúa formando un complejo con NF- $\kappa$ B (Wystub et al. 2004) o a través de Sp1 (W. Zhang et al. 2011). Además, la expresión de Ngb también puede venir modulada por la acción de otros factores como la hormona  $17\beta$ -estradiol (E2), puesto que existe una región activadora en el primer intrón a la que puede unirse el receptor  $\alpha$  de E2 (RE $\alpha$ ) cuando se encuentra activo (Guglielmotto et al. 2016).

### 1.1.9. Expresión y localización

La Ngb se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del sistema nervioso central y periférico, especialmente en el la médula espinal, bulbo olfatorio, nervio óptico, núcleo del tracto solitario, corteza cerebral (capas II-IV) y ciertas regiones subcorticales como hipocampo, amígdala y tálamo (Hankeln et al. 2004; Reuss et al. 2002; Wystub et al. 2003). En aquellas células metabólicamente muy activas (células retinales y neuronas hipotalámicas), la Ngb se encuentra a una concentración 100 veces más elevada que en el resto del cerebro (100  $\mu$ M) (Burmester et al. 2000; Schmidt et al. 2003). También se ha descrito la presencia de Ngb en ganglios periféricos y en líquido cefalorraquídeo (Casado et al. 2005).

Además del cerebro, órgano en el que fue descubierta, la Ngb también se encuentra de forma mucho más minoritaria en otros órganos como el corazón, el tracto gastrointestinal, en el tejido de ciertos tipos de tumores (mama o pulmón) y órganos endocrinos (glándulas pituitaria y adrenal) (Hankeln et al. 2004; Reuss et al. 2002).

Esta proteína se encuentra mayoritariamente en las neuronas, sin embargo, se ha descrito su expresión en astrocitos en cultivo así como *in vivo* en astrocitos reactivos bajo condiciones de hipoxia o en modelos animales tras la inducción de daño traumático cerebral (X. Q. Chen et al. 2005; DellaValle et al. 2010; Dong et al. 2010; Mitz et al. 2009).

La localización subcelular de la Ngb ha sido ampliamente discutida. Se ha descrito clásicamente en el soma celular, en los procesos axonales y en los terminales sinápticos (Geuens et al. 2003; Hankeln et al. 2004; Reuss et al. 2002; Schmidt et al. 2003; Wystub et al. 2003). Sin embargo, estudios de microscopía electrónica y fraccionamiento celular han demostrado presencia de proteína y ARNm en la membrana interna mitocondrial y en el núcleo de neuronas (De Marinis et al. 2013; Hundahl et al. 2010). Además, la localización subcelular de la Ngb puede variar en presencia de ciertos estímulos como hormonas y estrés oxidativo (De Marinis et al. 2013; Fiocchetti et al. 2014).

### 1.1.10. Funciones de la Ngb durante el estado fisiológico

#### A. Aporte de oxígeno

El cerebro es un órgano con unas necesidades energéticas elevadas y una reducida capacidad de almacenamiento de energía. Debido a la presencia del grupo hemo, la Ngb en estado férrico (met-Ngb o Ngb III) es capaz de unir  $O_2$  de forma reversible, oxidándose a su estado ferroso (oxi-Ngb o Ngb II). Aunque su afinidad teórica por este ligando es elevada, la

sexta coordinación del grupo hemo por parte de la His(E7)64 reduce la accesibilidad del O<sub>2</sub> al átomo de Fe y disminuye su afinidad (2 Torr). Esta afinidad es incompatible con una función fisiológica de transporte de O<sub>2</sub> a la mitocondria, función que es llevada a cabo por la Cyb en el cerebro (1 Torr) (Dewilde et al. 2001; Fago et al. 2004).

#### B. Propiedades antioxidantes y de secuestro de ROS

Una de las funciones más importantes de la Ngb es la reducción del estrés oxidativo mediante su interacción con ROS y RNS. Se ha demostrado la capacidad de esta proteína para secuestrar especies reactivas como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>-</sup> (W. Li et al. 2011).

En condiciones de normoxia, la met-Ngb presenta puentes disulfuro entre sus residuos Cys(CD45)46 y Cys(D5)55. Esta estructura tiene una relevancia fisiológica muy importante porque condiciona la unión de ligandos al grupo hemo de la Ngb.

En situaciones donde hay un desequilibrio de O<sub>2</sub>, como en condiciones de hipoxia, dicho puente se rompe, permitiendo la unión de la Ngb al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a los nitritos generados durante el proceso isquémico y eliminándolos así del medio. En condiciones oxidantes, en cambio, la Ngb III es reducida a Ngb II-NO por el óxido nítrico (NO) mediante nitrosilación reductora. Este complejo es rápidamente oxidado por ONOO<sup>-</sup> para producir Ngb III, en una reacción que no produce residuos tóxicos, como ocurre con la Mb y la Hb. De esta manera, se reduce la oxidación ejercida el ONOO<sup>-</sup> (Herold et al. 2004).

Por lo tanto, el estado redox del grupo hemo y la formación del puente Cys, determinan la unión de la Ngb a determinados ligandos y condiciona por tanto su función antioxidante, cuya potencia es comparable a la del ácido ascórbico (Yamashita et al. 2014).

Cabe destacar también la capacidad de esta proteína de unir otros ligandos como el monóxido de carbono (CO), que tiene un papel citoprotector en contextos de isquemia y enfermedades neurodegenerativas. Además, la unión Ngb-CO aumenta el tamaño de la cavidad del grupo hemo y permite la unión de pequeños ligandos con relevancia fisiológica (Ascenzi 2016).

#### C. Propiedades antiapoptóticas

La muerte celular por apoptosis puede activarse por el receptor de muerte (vía extrínseca) o por un mecanismo dependiente de la mitocondria (vía intrínseca). Numerosos estímulos pueden activar la vía intrínseca, y todos ellos inducen la activación de proteínas de

la familia Bcl-2, como Bax y Bak. Ciertas proteínas (como Bcl-2) son capaces de inhibir esta vía y en consecuencia bloquear el proceso apoptótico. Cuando la vía está activada, se produce la permeabilización del poro externo de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas señalizadoras del proceso apoptótico. Entre estas proteínas se encuentra el citocromo c, que inicia la formación del complejo proteico denominado apoptosoma y desencadena la vía apoptótica dependiente de caspasas (Raychaudhuri et al. 2010).

La presencia de Ngb en la mitocondria está estrechamente relacionada su capacidad antiapoptótica, ya que interacciona con proteínas mitocondriales con una gran relevancia fisiológica: VDAC, Efta (ambas relacionadas con la cadena transportadora de electrones) y citocromo c. (Burmester et al. 2007; De Marinis et al. 2013; Fiocchetti et al. 2014). En condiciones de privación de oxígeno y glucosa (OGD) y de estrés oxidativo, la Ngb se trasloca a la mitocondria e interacciona con citocromo c para evitar su liberación del citosol e inhibir así la cascada molecular implicada en apoptosis. Dado que el citocromo c es una proteína con capacidades redox, el complejo Ngb-citocromo c está involucrado en un proceso de cesión de electrones que condiciona la capacidad apoptótica de citocromo c. De este modo, el citocromo férrico es reducido por Ngb a su forma no apoptótica citocromo c ferroso (Raychaudhuri et al. 2010).

Además, en condiciones de estrés oxidativo, la Ngb en su estado férrico es capaz de interaccionar con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas  $G_{i/o}$  heterotriméricas ( $G\alpha_{i/o}$ ). Su unión al complejo  $G\alpha_{i/o}$ -GDP bloquea la acción de la adenilato ciclasa, actuando como un inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI) (Wakasugi 2003). De este modo se inhibe la vía apoptótica activada por  $G\alpha$  al mismo tiempo que se favorece la activación de la vía pro-supervivencia PI3-Akt inducida por  $G\beta$  (Schwindinger and Robishaw 2001). Es necesario que la Ngb se traslade a los rafts lipídicos para realizar esta función protectora. Para ello, esta proteína interacciona con flotilina-1, una proteína asociada a estos microdominios (Wakasugi et al. 2004; Watanabe et al. 2012).

#### 1.1.11. La Ngb en patologías

La función neuroprotectora de la Ngb ha sido fundamentalmente estudiada en condiciones de dishomeostasis de  $O_2$  como hipoxia y estrés oxidativo.

En modelos *in vitro* de estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$ , el silenciamiento de la expresión de Ngb en células N2a reduce la viabilidad celular mediante la activación de la vía

apoptótica dependiente de caspasas (Ye et al. 2009). De manera complementaria, la sobreexpresión de esta globina en el neuroblastoma SH-SY5Y y en células PC12 reduce la producción de ROS y RNS, la disfunción mitocondrial y, en último término, inhibe la respuesta apoptótica inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fordel et al. 2006; R. C. Li et al. 2008b).

En condiciones de isquemia *in vivo* y en modelos *in vitro* de hipoxia inducida por privación de O<sub>2</sub> y glucosa (OGD), la Ngb ejerce un papel fundamental en la supervivencia celular.

Las células PC12 sometidas a hipoxia y reoxigenación sobreviven mejor cuando expresan Ngb, debido a la capacidad GDI de la Ngb (Watanabe and Wakasugi 2008). De manera similar, el silenciamiento de la expresión de Ngb demuestra que la resistencia a OGD de células SHSY5Y está mediada por esta proteína, mediante su unión a citocromo C y la consecuente inhibición de apoptosis (Y. J. Wang et al. 2017).

En ratones Tg-Ngb sometidos a isquemia transitoria, el área cerebral infartada es menor que en los WT, lo cual demuestra *in vivo* la protección de la Ngb en condiciones de hipoxia (X. Wang et al. 2008).

#### 1.1.12. Ngb y EA

La función protectora de la Ngb también se ha demostrado en el contexto de la EA, en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Ciertos estudios genéticos han demostrado una asociación significativa entre la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen de la Ngb y el riesgo de desarrollar EA (Szymanski et al. 2010). Además, la disminución en la expresión de la Ngb con la edad podría explicar la mayor susceptibilidad a padecer EA con el envejecimiento (Y. Sun et al. 2005; Szymanski et al. 2010). De manera muy interesante, la expresión de esta proteína en pacientes con EA tiene un comportamiento bifásico a lo largo del tiempo. En estadios tempranos y moderados, la expresión de Ngb en corteza e hipocampo es 2-3 veces mayor que los controles sanos de la misma edad. Sin embargo, en las etapas finales de la enfermedad, cuando el declive cognitivo es muy evidente, esta expresión cae hasta los niveles de pacientes sanos (Y. Sun et al. 2005; Szymanski et al. 2010).

La sobreexpresión de Ngb protege frente a numerosos efectos neurotóxicos ejercidos por A $\beta$  en modelos *in vitro*. Las neuronas de ratones que sobreexpresan Ngb (Tg-Ngb) muestran más resistencia a la fragmentación nuclear y muerte celular inducida por A $\beta$ <sub>25-35</sub>.

Además, la polarización de membrana y agregación mitocondrial que produce el péptido, es menor en las neuronas corticales derivadas de dichos ratones (Khan et al. 2007b; Khan et al. 2007a). De manera similar, en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y transfectada con APP mutado, la sobreexpresión de Ngf previene la muerte inducida por apoptosis (Y. Li et al. 2016); y en la línea de neuroblastoma PC12 tratada con  $A\beta_{42}$  inhibe vía apoptótica dependiente de caspasas (R. C. Li et al. 2008a).

En modelos transgénicos para la EA también se ha demostrado *in vivo* la protección llevada a cabo por la Ngf. Los ratones APP<sup>Swe,Ind</sup> presentan menos  $A\beta$  y un menor número de placas amiloides cuando se cruzan con ratones Tg-Ngf. Asimismo, la pérdida de memoria se recupera en parte en estos ratones (Khan et al. 2007a). En los ratones PS1dE9, la inoculación intracerebroventricular de Ngf es capaz de rescatar los déficits de memoria y aprendizaje y de disminuir la deposición de placas que presenta este modelo (Y. Li et al. 2016).

Además de proteger frente a la toxicidad inducida por  $A\beta$ , la acción de la Ngf también parece afectar a la fosforilación de tau. En el ratón Tg2576 para la EA, la reducción de la expresión de Ngf a lo largo del tiempo se correlaciona negativamente con la fosforilación de tau en el lóbulo temporal y parietal (L. M. Chen et al. 2012). Además, en este mismo estudio, se demostró que la inducción farmacológica de fosforilación de tau en células HEK se reduce cuando estas células sobreexpresan Ngf. La ruta de señalización involucrada en esta respuesta parece estar mediada por Akt, cuya activación llevada a cabo por la Ngf inhibe la acción de la GSK3- $\beta$  (kinasa glucógeno sintasa 3  $\beta$ ) y, en último término, reduce la fosforilación de la proteína tau.

## 2. Objetivos

El propósito de esta tesis doctoral es comprender la resistencia de la población envejecida al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, con especial énfasis en los mecanismos moleculares que protegen frente a la toxicidad inducida por el A $\beta$ . Para ello se han establecido los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de la acumulación de A $\beta$  en la respuesta inmune, la proteostasis celular y respuesta a estrés en ratones App<sup>NL-F</sup>, que son un nuevo modelo para la enfermedad.
2. Evaluar los déficits comportamentales derivados de la acumulación de A $\beta$  en estos ratones.
3. Analizar la expresión de genes involucrados en la supervivencia neuronal en ratones App<sup>NL-F</sup> envejecidos.
4. Explorar los mecanismos de activación de las vías de supervivencia y estudiar su función protectora frente a la toxicidad inducida por A $\beta$ .



### 3. Materiales y métodos

#### Sujetos experimentales

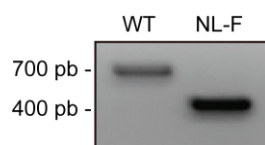
Todos los procedimientos experimentales con animales de laboratorio se realizaron de acuerdo con la directiva europea traspuesta al ordenamiento jurídico español en el RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

##### 3.1.1. Ratones

Los estudios se llevaron a cabo en ratones App<sup>NL/F</sup>. Este modelo de ratón se creó a partir de ratones C57BL6 cuyo gen App se modificó mediante la técnica *knock-in* para presentar las mutaciones *Swedish* (KM670/671NL) y *Beyreuther/Iberian* (I716F) (Saito et al. 2014). Estos ratones sobreexpresan los fragmentos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> pero presentan niveles normales de la proteína APP. Como controles se emplearon ratones hermanos *wild type* de la misma colonia.

##### 3.1.2. Genotipado

Para la identificación genética de ratones App<sup>NL/F</sup> homocigotos se extrajo ADN genómico de la cola mediante la digestión del tejido con proteinasa K (Merck) a 10 mg/ml en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 100mM, SDS 1%) a 60 °C durante 2 h y posteriormente se purificó el ADN para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificaron los fragmentos correspondientes al alelo WT (700 pb) o al alelo mutado (400 pb) empleando para ello los siguientes oligonucleótidos: WT *forward* ATCTCGGAAGTGAAGATG, WT *reverse* TGTAGATGAGAACTTAAC; NL-F *forward* ATCTCGGAAGTGAATCTA, NL-F *reverse* CGTATAATGTATGCTATACGAAG. Se empleó un programa de PCR con el siguiente protocolo (Tª, duración, número de ciclos): (i) 94 °C, 3 min, 1 ciclo (ii) 94 °C, 30 s, 57 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 30 ciclos (iii) 72 °C, 1 min, 1 ciclo; el producto de la PCR se marcó con RedSafe™ y se separó por electroforesis en gel de agarosa para visualizar los fragmentos amplificados (Figura 3.1).



**Figura 3.1 Genotipado de los ratones  $App^{NL-F}$  mediante PCR.** Imagen representativa de los fragmentos de ADN amplificados por PCR y separados en un gel de agarosa en un animal WT y  $App^{NL-F}$  homocigoto.

### 3.1.3. Perfusión

Los ratones se sedaron profundamente con una inyección intraperitoneal (ip) de pentobarbital sódico (500mg/Kg) y se perfundieron trans-cardialmente con cloruro sódico al 0,9%. A continuación, se extrajo el cerebro y se separaron el hemisferio izquierdo y derecho para estudios de histología y bioquímica, respectivamente. Los ratones a los que se les inyectó el lentivirus se perfundieron con suero salino y seguidamente con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato-salino (PBS) y sacarosa 0,2 M pH 7,4, ya que en estos sujetos no se realizaron estudios bioquímicos. En este caso, el cerebro completo se procesó para histología como se describe más adelante.

## Cultivos primarios de neuronas corticales

Para preparar cultivos de neuronas corticales disociadas se emplearon embriones en estadio 18 de gestación (E18). Tras diseccionar las cortezas cerebrales en medio HBSS (Hanks Buffer Salt Solution  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  free, T) se digirieron con tripsina (Thermo Fisher Scientific) al 0,012% durante 15 min a 37 °C. A continuación, se disgregó el tejido y se resuspendió en medio MEM (Minimum Essential Media, Thermo Fisher Scientific) con glucosa al 20% y suero de caballo (Invitrogen) al 10%. Las células se sembraron en ese mismo medio sobre placas de cultivo sobre cubreobjetos o placas de cultivo previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma) a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> para análisis bioquímicos y 9.000 células/cm<sup>2</sup> para inmunofluorescencia. Una vez adheridas las neuronas a la superficie (alrededor de 3 h) se cambió a medio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) suplementado con B27 (Thermo Fisher Scientific) y Glutamax (Thermo Fisher Scientific). Las neuronas se mantuvieron en cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante el tiempo necesario, cambiando la mitad del medio una vez a la semana y eliminando el Glutamax a partir del séptimo día *in vitro* (DIV 7).

## **Técnicas comportamentales**

### **3.1.4.Laberinto acuático de Morris**

El laberinto acuático de Morris es un paradigma experimental ampliamente utilizado en neurociencia para evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria en roedores, procesos cognitivos relacionados con el hipocampo y la corteza cerebral. Los ratones se colocan en una piscina con agua a  $21 \pm 1$  °C y deben aprender a encontrar la plataforma que se encuentra sumergida. Para ello, se colocan pistas visuales en la habitación que les permiten orientarse y ser capaces de navegar hasta la plataforma, donde son recogidos por el experimentador (Figura 3.2).

Antes de comenzar el experimento, durante 2 días los ratones se introducen en la piscina con una plataforma visible y se comprueba que todos ellos son capaces de ver y nadar correctamente. Además, en este periodo los ratones se habitúan a la piscina y aprenden que llegando a la plataforma salen de la piscina.

En la fase de aprendizaje, los ratones se introducen en la piscina mirando hacia la pared desde 4 posiciones diferentes cada día, determinadas de manera aleatoria. Se deja al ratón nadar hasta que encuentre la plataforma, y se mide el tiempo que tarda en alcanzarla. Si transcurridos 2 min no la encuentran, se les guía hasta ella y después de 30 s encima de la plataforma, se les saca de la piscina. Se realizaron 4 sesiones al día, con 1 min de descanso entre ellas, hasta que los ratones aprendieron a encontrar la plataforma (4 días).

El quinto día se realiza el test con el que se valorará la memoria de cada sujeto. La plataforma se retira de la piscina y se deja nadar al ratón durante 90 s. En este caso, se valora el tiempo que el ratón pasa en el cuadrante donde se encontraba la plataforma (Q1) y en el cuadrante opuesto (Q3). Los ratones que recuerdan la posición de la plataforma deberían pasar más del 25% del tiempo en Q1 (Figura 3.2).

A partir del sexto día se realizó la prueba de aprendizaje inverso para evaluar el aprendizaje dependiente de la corteza prefrontal y la memoria de trabajo. Para ello, se volvió a introducir una plataforma oculta, pero esta vez en el Q3, de manera que los ratones deben aprender la nueva posición de la plataforma. Se realizaron 4 sesiones al día durante 4 días.

### **3.1.5.Condicionamiento al miedo**

La memoria dependiente de hipocampo y amígdala se valoró mediante el test de condicionamiento al miedo. En esta prueba los ratones reciben un estímulo incondicionado

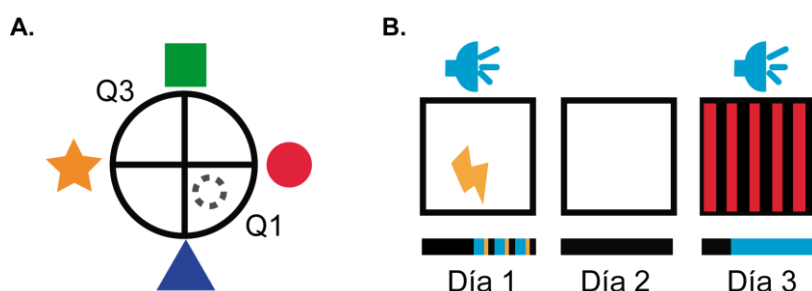
(tono de 3 KHz de frecuencia y 80 dB) y un estímulo aversivo condicionado (descargas eléctricas en las patas de 0,8 mA de intensidad). El experimento tiene lugar en una caja con suelo metálico electrificado y cubierta de metacrilato de color rojo para impedir que el animal vea el exterior, pero permitiendo al experimentador valorar los movimientos del ratón durante todo el experimento.

El día 1, se introdujo al ratón en la caja y se le dejó habituarse al entorno durante 3 min. Transcurrido este tiempo, se aplicaron 3 sesiones de choques eléctricos de 2 s de duración cada uno y precedidos cada uno de ellos de un tono de 20 s (Figura 3.2). Durante esta sesión, el ratón aprende a asociar el contexto y el tono con las descargas eléctricas.

El día 2, el ratón volvió a introducirse en el mismo compartimento durante 5 min. Los sujetos capaces de asociar el contexto con las descargas eléctricas muestran un comportamiento de total inmovilización, cuya duración se valoró como índice de memoria asociada al miedo.

Durante el día 3, se valora la memoria asociada a la amígdala, para lo cual se cambia completamente el contexto (condiciones de luz, olor, compartimento) y se emite el mismo tono que el primer día. Tras dejar al ratón habituarse al nuevo contexto durante 2 min, se emite el tono durante 5 min. El tiempo de inmovilización en este caso se interpreta como la capacidad de asociar el tono con las descargas eléctricas, y mide un tipo de memoria que está relacionada con la amígdala.

El último día se comprobó que todos los ratones presentan la misma sensibilidad en las patas, para lo cual se valoró la intensidad mínima a la cual los sujetos muestran signos de dolor (vocalizaciones y saltos).



**Figura 3.2. Esquema del paradigma experimental de las pruebas de comportamiento utilizadas.** (A) Representación gráfica del laberinto acuático de Morris donde se observa la localización de la plataforma (círculo gris), la numeración de los cuadrantes estudiados y la posición de las pistas visuales. (B) Esquema temporal de la prueba de condicionamiento al miedo donde se

indica la aplicación de los choques eléctricos (rayo) y del tono (altavoz), así como el contexto espacial al que es sometido el ratón durante los diferentes días.

### **Registro de la actividad de campo (*field recording*)**

Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs) se registraron en *stratum radiatum* de CA1 de rodajas hipocámpales. La cámara de registro se perfundió con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF: NaCl 120 mM, KCl 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 11 mM) con picrotoxina 0,1 mM y en burbujeo con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Se colocaron electrodos de estimulación bipolares entre los colaterales de Schaffer y el vidrio de los electrodos de registro (1-2 MΩ; cubierto con aCSF) y a 200 μm, en la dirección de proyección de las fibras. La profundidad del electrodo de registro y de estimulación se ajustó para alcanzar un tamaño de respuesta sináptica máximo en la región de CA1 dada. Se realizaron registros a 0,066 Hz con estímulos de 50 μs de duración, y se adquirió una línea basal estable de 20-30 min antes de la manipulación experimental. Se generó una curva *input-output* y se estableció un estímulo tal que produjera una respuesta máxima del 50 o 30% de la respuesta máxima para la depresión a largo plazo (LTD) y potenciación a largo plazo (LTP), respectivamente. La LTD se indujo mediante estimulación a baja frecuencia de las fibras colaterales de Schaffer (900 pulsos a 1 Hz). Para inducir LTP se utilizó un protocolo de estimulación en ráfaga *theta-burst* (TBS): 4 series (a intervalos de 20 s) de 10 *bursts* (a 5 Hz) de 4 pulsos (a 100 Hz). Los gráficos muestran la media de 8 sesiones, para las cuales se valoró la pendiente inicial media en una ventana de tiempo de 1 ms.

### **Técnicas bioquímicas**

#### **3.1.6. Procesamiento de cerebro (congelación, trizol, Paris kit)**

Salvo que se indique lo contrario, para los estudios bioquímicos se diseccionaron el hipocampo y la corteza y se homogenizaron en tampón de disrupción (Thermo Fisher Scientific) con inhibidores de proteasas (cOmplete™, Sigma-Aldrich), de fosfatasas (Sigma-Aldrich) y de RNAsas (Roche). Las proteínas y el ARNm se purificaron utilizando un kit comercial con sistema de columnas que no necesita fenol (PARIS™ Kit, Thermo Fisher Scientific).

#### **3.1.7. Procesamiento de cultivos celulares**

Después de incubar los cultivos neuronales durante los días correspondientes según el estudio, se lavaron con PBS y se extrajeron las proteínas o el ARNm. Para el análisis de expresión de proteína, las neuronas en cultivo se lisaron y homogenizaron en tampón RIPA

con inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich) y de proteasas (cOmplete™, Sigma-Aldrich). En el caso de estudio de ARNm se homogenizaron las células en TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) y se purificó el ARNm mediante un kit comercial con sistema de columnas (Direct-zol™ RNA MiniPrep, Zymo Research).

### 3.1.8. Valoración de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas presente en los homogenizados mediante el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del kit comercial.

### 3.1.9. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)

Se prepararon las proteínas en tampón Laemmli (TrisHCl 25mM pH 6,8, dodecil sulfato sódico (SDS) 1%, glicerol 3,5%, 2-mercaptoetanol 0,4% y azul de bromofenol 0,04%) y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS a voltaje constante. Posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y tras bloquear las uniones inespecíficas con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en Tween-20 al 0,1% en PBS (TPBS), dichas membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, y tras lavar las membranas con TPBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios pertinentes acoplados a peroxidasa de rábano y diluidos 1/5000 en TPBS durante 1 h a RT. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron con luminol (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific) y se midió la quimioluminiscencia utilizando una cámara CCD (Amersham Imager 680). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se densitometraron mediante el *software* de procesamiento de imagen digital FIJI y se normalizaron respecto a los valores obtenidos para la proteína de control de carga GAPDH.

Proteína	Casa comercial	Especie	Dilución	
			IF	WB
Akt	Cell Signaling (9272S)	R		1:500
Bcl-2	Bioworld (BS1511)	R		1:500
CD45	Abcam (ab10558)	R	1:1000	
Tau 5	Thermo (AHB0042)	M		1:500
GAPDH	Abcam (ab8245)	M		1:10000

GFAP	Millipore (MAB3402)	R	1:1000	
GSK3 $\beta$	Invitrogen (44610)	R		1:500
Hsp-70	Enzo (Adi-SPA-812-D)	R		1:1000
Iba-1	Wako (019-19741)	R	1:1000	
JNK	Cell Signaling (9252S)	R		1:500
LAMP 2A	Invitrogen (512200)			1:500
LC3	Sigma (L8918)	R		1:1000
NeuN	Abcam (ab104225)	R	1:1000	
Neuroglobina	Genetex (GTX55452)	R		1:500
	Sigma-Aldrich (N7162)	R	1:200	
P62	Cell signaling (5114S)	R		1:500
pSer473 Akt	Cell Signaling (4060S)	R		1:500
pThr180/Tyr182 p38 MAPK	Cell Signaling (2821S)	R		1:1000
pThr183/Tyr185 JNK	Cell Signaling (9251S)	R		1:500
pTyr216 GSK3 $\beta$	Millipore (05-413)	M		1:500
p38 MAPK	Abcam (170099)	R		1:1000
Ser396/Ser404 Tau (PHF1)	Abcam (ab66275)	R		1:500
t-GFP	Thermo (PA5-22688)	R	1:2500	1:2000

**Tabla 1. Relación de los anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia (IF) y western blot (WB).** R: *rabbit*; M: *mouse*.

### 3.1.10. PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Se valoró mediante qPCR la cantidad de ARNm presente en corteza de ratón o en neuronas en cultivo. Para ello se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando un kit comercial (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific) bajo un programa de PCR de 3 pasos ( $T^a$ , duración): (i) 25 °C, 5 min; (ii) 42 °C, 60 min; (iii) 70 °C, 5 min.

A continuación, se realizó la qPCR utilizando una mezcla madre comercial (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega) que contiene el colorante SYBR® Green y todos los componentes necesarios para la reacción, y a la cual se le añadió carboxi-X-rodamina (CXR) (Promega). Los oligonucleótidos necesarios para amplificar la región de interés se diseñaron en regiones de exones flanqueando intrones largos, para evitar así la amplificación de ADN genómico. Los oligonucleótidos utilizados para cada gen se describen en la Tabla 2:

Gen	Secuencia FWD	Secuencia REV
bvra	GGATATGTGTCCAGACGAGAAC	ATAGGCGACATCAACCTCTTG
Ephx2	GGAGAAGGTCACAGGGACAC	TTTGGATTGCATGGGACTG
FOXO3A	GTTTGGACCTTCGTCTCTGAA	GTAGTGTGACACGGAAGAGAAG
Hsf1	CCCTGAAGAGTGAGGACATAAA	GAGTCCATACACTCCTGTTTCC
Neuroglobin	ACTGTCTCTCCTCTCCAGAAT	CAGGTACTCCTCCAATGAAGAC
Pin 1	GCAGAGGTCAGATGCAGAAA	TCTGTGCGCAGGATGATATG
progranulin	GGGCATTTCTGCCATGATAAC	CAACAGTGACGTCCATCTCTAC
qpct	CTGACAGCTGGGAATCTGAGT	TGAAGTCTCTGAATTCGTTGC
Slc2a13	GTCACCATCAACACCCTCTT	CATGTACCTCCATCCATCCTTC
Tmem106b	CTTGCCAAGGAACAGGAAGA	CACAGACGCCATCACATACA

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de interés**

Se empleó el equipo ABI PRISM 7900HT SDS (Applied Biosystems) en el cual se programó un protocolo de PCR de 3 pasos (T<sup>a</sup>, duración, número de ciclos): (i) 95 °C, 2 min, 1 ciclo; (ii) 95 °C, 3 s, 60 °C, 30 s, 40 ciclos; (iii) 95 °C, 15 s, 60 °C, 15 s y recuperación con un incremento del 7%, hasta 95 °C, 1 ciclo. Se recogieron los datos de las curvas de amplificación y se cuantificó el C<sub>t</sub> (umbral de ciclo), como medida relativa de la concentración de producto de PCR. Además, se analizaron las curvas de fusión para comprobar la especificidad de la reacción. Todos los datos de qPCR se analizaron con el programa SDS (Applied Biosystems).

### 3.1.11. Medida de especies reactivas de oxígeno (ROS) en rodajas de corteza

Se valoró la presencia de ROS en la corteza de los ratones empleando dihidrorrodamina (DHR) (Thermo Fisher Scientific), un pigmento que al oxidarse en presencia de ROS emite fluorescencia verde. Tras extraer el cerebro y realizar secciones coronales de 350 µm de grosor, las rodajas se mantuvieron durante 1 h a 32 °C con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) burbujeado con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Posteriormente se incubaron durante 10 min con DHR 10 µM en aCSF a RT y en oscuridad. Tras 2 lavados de 15 min con PBS, las rodajas se fijaron durante 2 h con PFA al 4% y posteriormente se lavaron y se bloquearon las uniones inespecíficas durante 30 min con



tampón de bloqueo (BSA 2% y Tritón X-100 al 0,5% en PBS). Se marcaron los núcleos celulares con DAPI 1:5000 en PBS durante 15 min y se montaron con Mowiol sobre un portaobjetos para su observación en el microscopio confocal (DAPI:  $\lambda=405$  nm ; DHR:  $\lambda=488$  nm).

Se valoró la intensidad de señal en el canal verde tras extraer la señal de los gránulos de lipofuscina, que son autofluorescentes en todas las longitudes de onda.

### 3.1.12. Valoración de gránulos de lipofuscina en rodajas de corteza

Las mismas rodajas empleadas para la valoración de ROS (sección 3.1.12) se utilizaron también para la cuantificación de gránulos de lipofuscina. Al ser autofluorescentes, los gránulos pueden observarse al excitar la muestra con cualquier longitud de onda, aunque el pico de excitación se encuentra en 578 nm. Se eligió el láser 555 para excitar y valorar la señal perinuclear de los gránulos de lipofuscina, y el láser 405 para detectar los núcleos que habían sido previamente marcados con DAPI.

Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia de los gránulos, así como el porcentaje de área de imagen positivo para lipofuscina.

### 3.1.13. Cuantificación de A $\beta$ (MesoScale)

Para estudiar la cantidad de fragmentos tóxicos de A $\beta$  se extrajo el A $\beta$  soluble e insoluble de la corteza de ratones App<sup>NL-F</sup> de 3, 9 y 24 meses de edad.

Tras perfundir al animal con suero salino, se extrajo el cerebro y se diseccionaron las cortezas, que se homogeneizaron en 500  $\mu$ l de tampón de homogenización (Tris HCl 0,5 M, NaCl 0,15 M Tween-20 0,05% EDTA 2mM, pH 7,6) con inhibidores de proteasas (cOmplete<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich). A continuación, la muestra se ultracentrifugó a 200.000 g durante 20 min a 4 °C para separar la fracción soluble e insoluble. El sobrenadante (fracción soluble) se reservó para su posterior análisis, y el pellet se resuspendió en cloruro de guanidinio HCl (GndCl) 6 M, se sonicó y se agitó durante 1 h a 23 °C, para solubilizar el A $\beta$  insoluble. Seguidamente, se ultracentrifugó a 200.000 g 20 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante (fracción insoluble).

Se midieron los niveles de A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  mediante la técnica MSD (*Meso Scale Discovery*), en la cual se realiza un inmunoensayo (ELISA) que posteriormente es detectado por electroquimioluminiscencia. Para ello se emplean placas de 96 pocillos *multi-spot*, en los cuales hay 4 puntos con anticuerpos de captura para los diferentes (blanco, A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  y

A $\beta$ <sub>42</sub>). Tras bloquear los pocillos con 150  $\mu$ l de tampón de bloqueo (caseína al 0,1% en PBS) durante 2 h a RT y en agitación, se lavaron 5 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado (Tween-20 al 0,05% en PBS). A continuación, se preparó una dilución de la muestra problema o de los péptidos estándar (péptidos A $\beta$ <sub>38</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> sintéticos de humano) con el anticuerpo de detección conjugado con un marcador de electroquimioluminiscencia (SULFO-TAG<sup>TM</sup>) y se cargaron 50  $\mu$ l en cada pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche y al día siguiente se lavaron 2 veces con 150  $\mu$ l de tampón de revelado comercial (MSD T), tras lo cual se valoró la electroquimioluminiscencia con el aparato MSD Sector Imager 6000.

#### 3.1.14. Tratamiento de neuronas con A $\beta$ soluble de App<sup>NL-F</sup>

Para tratar neuronas WT en cultivo con A $\beta$  de ratones App<sup>NL-F</sup>, se perfundieron animales de 20 meses con suero salino y se extrajo el A $\beta$  soluble del cortex. Para ello, tras diseccionar las cortezas y homogenizarlas en PBS con inhibidores de proteasas, se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar el debris. Seguidamente, se sedimentó el A $\beta$  insoluble mediante ultracentrifugación a 200.000 g durante 30 min a 4 °C y se recogió la fracción soluble para tratar las células (A $\beta$  soluble). Como control de tratamiento se utilizó esta fracción inmunodepletada de A $\beta$ . Para ello, se realizaron 2 inmunoprecipitaciones consecutivas de A $\beta$  con los anticuerpos 6E10 (Covance) y 4G8-biotina (Biolegend) (durante 2 h, 4 °C) y los secundarios correspondientes (anti-IgG o estreptavidina) conjugados con microesferas de agarosa (toda la noche, 4 °C), que se centrifugaron durante 5 min a 600 g. El sobrenadante se utilizó como control inmunodepletado. Por último, se incluyó también un control de extracto de WT, para lo cual se extrajo el A $\beta$  presente en el cerebro de ratones WT de la misma manera que los App<sup>NL-F</sup>.

Se valoraron los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> en cada uno de los extractos mediante un ELISA para A $\beta$ <sub>42</sub> (Wako) siguiendo las indicaciones del kit. A $\beta$  soluble de App<sup>NL-F</sup> (670 pM), control inmunodepletado de App<sup>NL-F</sup> (9 pM) y A $\beta$  soluble de WT (3 pM). También se valoró la cantidad de proteína de cada extracto mediante el ensayo de BCA (Thermo Fisher Scientific).

Las neuronas WT se trataron con A $\beta$ <sub>42</sub> soluble de App<sup>NL-F</sup> a 10, 5, 2 o 1  $\mu$ M y con la cantidad necesaria de los controles inmunodepletado y WT para igualar la concentración de proteína. Se cambió el medio progresivamente a N2, y los tratamientos se realizaron a DIV 20 (agudo) o DIV 17 (crónico) y se valoró la expresión de NgB a DIV 21.

### 3.1.15. Tratamiento de neuronas con A $\beta$ <sub>42</sub> sintético

El A $\beta$ <sub>42</sub> sintético de humano (Anaspec) se resuspendió en DMSO (hasta 5 mM) y se sonicó para asegurar una disolución homogénea de monómeros. Esta preparación se agregó para formar oligómeros o fibrillas siguiendo diferentes protocolos.

Para formar oligómeros, se diluyó el péptido a 100  $\mu$ M en DMEM y tras una agitación con vórtex, se incubó toda la noche a 4 °C. Para obtener fibrillas, se diluyó el A $\beta$  a 250  $\mu$ M en agua, se agitó con vórtex y se dejó agregando a 37 °C durante 7 días. Se comprobó el estado de agregación del péptido mediante microscopía electrónica (FOTOS).

Las neuronas en cultivo se trataron con A $\beta$  oligomérico para estudiar la arborización dendrítica (100 nM), la respiración mitocondrial (10  $\mu$ M) o la expresión de Ngb (5  $\mu$ M). Para valorar la expresión de Ngb mediada por A $\beta$ , el medio de cultivo con neurobasal se cambió gradualmente a medio N2 y el DIV 8 se trataron las neuronas con N-acetilcisteína (NAC) 2 mM o con vehículo, y 2 h más tarde con A $\beta$  5  $\mu$ M.

### 3.1.16. Tratamiento de neuronas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Los tratamientos de neuronas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon en el momento, haciendo las diluciones correspondientes en agua y de tal manera que el volumen de tratamiento no fuera superior al 10% del volumen total de medio.

En el caso del tratamiento de neuronas para valorar la expresión de Ngb, el medio de cultivo con Neurobasal se sustituyó gradualmente con medio N2 para eliminar los antioxidantes que pudieran enmascarar la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.1.17. Toxicidad de los tratamientos (LDH)

La toxicidad de los tratamientos *in vitro* se valoró mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular. Al finalizar el tratamiento correspondiente, se recogieron 500  $\mu$ l del medio de cultivo y se utilizaron para realizar un ensayo colorimétrico con un kit comercial (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). La reacción enzimática en presencia de LDH produce formazán, cuyo pico de absorbancia es 490 nm. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad de cada tratamiento considerando como 100% un pocillo de células tratado con tampón de lisis.

### 3.1.18. MTT

La viabilidad mitocondrial se valoró mediante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (Sigma). El MTT es un compuesto soluble y su reducción

mitocondrial produce formazán, cuya concentración es valorada por absorbancia. Para este experimento, se plaquearon 10.000 neuronas por pocillo en una placa de 96 pocillos y el DIV 6 se infectaron con lentivirus Scr o Ngb<sup>+</sup>. Tras los tratamientos correspondientes el DIV 10, al día siguiente se retiró el medio y se sustituyó por 100 µl de MTT al 0,5% diluido en medio N2. Las células se mantuvieron a 37 °C durante 4 h para permitir la formación de cristales de formazán, los cuales fueron disueltos añadiendo 50 µl de DMSO. Tras 15 min a 37 °C se leyó la absorbancia a 560 nm.

## **Procedimientos histológicos**

### **3.1.19. Fijación y procesamiento de tejido (PFA, postfixation, vibratomo)**

El hemisferio izquierdo del cerebro de los ratones se fijó por inmersión con PFA al 4% y sacarosa 0.2 M en PBS durante una noche a 4 °C. Después se crioprotegieron con sacarosa al 30% en PBS, tras lo cual se realizaron secciones sagitales de 40 µm de grosor con un vibratomo (Leica VT1200 S). Las secciones se recogieron y mantuvieron a -20 °C en una solución crioprotectora (etilenglicol al 30% y glicerol al 26% en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7).

### **3.1.20. Fijación de neuronas en cultivo**

Los cubreobjetos con neuronas en cultivo se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 15 min a temperatura ambiente (RT), tras lo cual se volvieron a lavar con PBS y se mantuvieron a 4 °C.

### **3.1.21. Inmunofluorescencia en tejido (Iba1, GFAP, Neuroglobin, tGFP)**

Las secciones de cerebro se permeabilizaron y bloquearon con solución de bloqueo (BSA 2% y Tritón X-100 al 0,5% en PBS) durante 1 h a RT y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante una noche a 4° C. Al día siguiente y tras realizar 3 lavados con PBS, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (dilución 1:500 en solución de bloqueo) durante 1 h a RT. A continuación, se lavaron con PBS y se marcaron los núcleos con DAPI (1:5000 en PBS) durante 15 min. Las secciones se montaron con Mowiol sobre portaobjetos, y se cubrieron con cubreobjetos para su visualización al microscopio confocal. Para cada reacción de inmunofluorescencia se incluyeron controles negativos con el fin de comprobar la especificidad del anticuerpo primario. Para ello, se emplearon secciones que fueron tratadas igual que las demás, pero a las que se añadió PBS en lugar de anticuerpo primario.

### 3.1.22. Inmunofluorescencia de cultivos neuronales

Las células fijadas sobre los cubreobjetos se bloquearon y permeabilizaron con solución de bloqueo (BSA 2% y Tritón X-100 al 0,1% en PBS) durante 1 h a RT y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C. Después de 3 lavados con PBS, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (1:5000 en PBS) durante 1 h a RT. Posteriormente se lavaron con PBS y los núcleos celulares se marcaron con DAPI (1:5000 en PBS)

### 3.1.23. Detección de placas mediante tioflavina S

La deposición de  $\beta$ -amiloide se detectó mediante el pigmento fluorescente tioflavina S (Merck), cuyos picos de excitación y emisión máxima son 430 nm y 550 nm, respectivamente. Dicho pigmento se une a las estructuras en lámina  $\beta$  presentes en las placas de  $\beta$ -amiloide. Los cortes de tejido se incubaron durante 15 min con tioflavina S al 0,1% en etanol diluido al 50% con agua destilada, tras lo cual se lavaron 2 veces con etanol al 50% y posteriormente con agua destilada.

Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 200 (Zeiss) acoplado a una cámara sCMOS, utilizando el filtro para GFP (Excitación 461-488 nm; Emisión 499-530 nm).

### 3.1.24. Análisis de la arborización dendrítica

Para estudiar la complejidad del árbol dendrítico se marcaron las dendritas por inmunofluorescencia: se empleó anti-tGFP o anti-MAP2 para las neuronas de animales inyectados con virus o para neuronas infectadas en cultivo, respectivamente. En ambos casos, se eligieron neuronas que estuvieran aisladas y se tomaron imágenes de confocal de varios planos (*z stack*) con un solapamiento del 40%. Las imágenes de 8 bits se procesaron con el programa *Simple Neurite Tracer* del software FIJI, mediante el cual se delinearon todas las dendritas visibles a lo largo de los tres ejes del espacio.

Posteriormente se estudió la complejidad morfológica mediante el análisis de Sholl, disponible en el mismo programa, en el cual se determina el número de neuritas que cruza cada uno de los círculos imaginarios de radio creciente (10  $\mu$ m) que se dibujan alrededor del soma. Se obtiene así una gráfica en la que se representa el número de intersecciones desde el soma celular hacia la periferia.

Se cuantificaron también el número de dendritas primarias (proyectan desde el soma celular) y dendritas secundarias o de mayor grado, así como el número de puntos de bifurcación.

## **Estudios con lentivirus**

### **3.1.25. Producción de lentivirus y titulación**

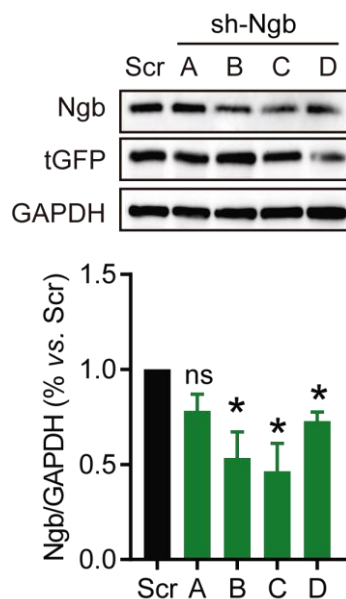
Todos los procedimientos necesarios para producir lentivirus se han llevado a cabo en una sala de cultivo con un nivel de bioseguridad P2.

Para los estudios de silenciamiento y sobreexpresión de Neuroglobina se emplearon los siguientes plásmidos:

**Plásmido control (Scramble)** (Origene: TR30021): contiene un casete de silenciamiento no efectivo con una secuencia aleatoria de nucleótidos (ver Figura 3.4)

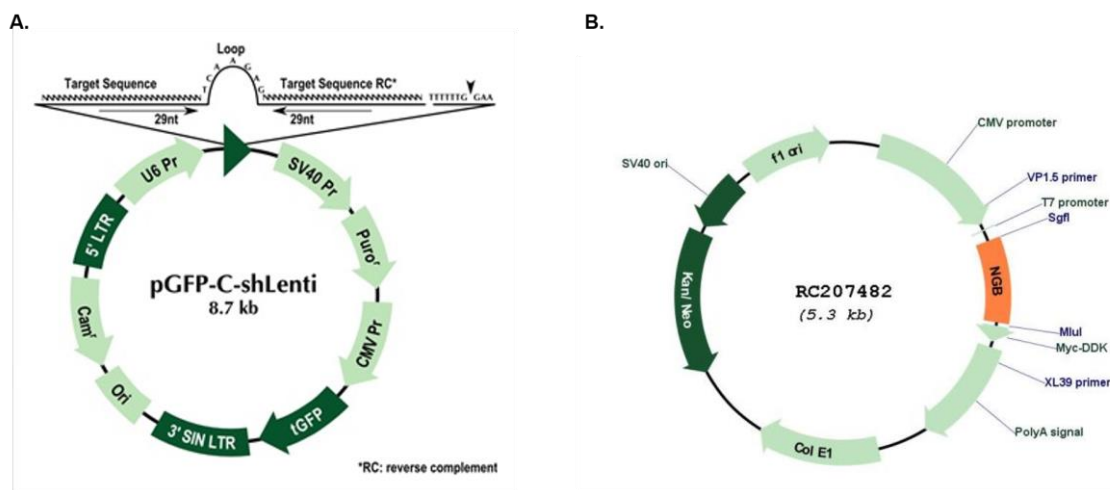
**Plásmido de silenciamiento (sh-NGB)** (Origene, TL503454): contiene una horquilla de shRNA con una secuencia de silenciamiento de 29 pb (siRNA) que presenta un 100% de alineamiento con el ARNm de ratón (ver Figura 3.4)

Se probó la eficacia de silenciamiento de 4 constructos diferentes (sh-Ngb A, B, C y D) mediante infección de cultivos neuronales (Figura 3.3) y se eligió el lentivirus sh-Ngb C para todos los experimentos que se muestran en esta tesis.



**Figura 3.3 Selección del plásmido de silenciamiento sh-Ngb.** Western blot de la expresión de Ngb en cultivos primarios de neuronas infectados con el virus Scr o con los constructos A, B, C y D del virus de silenciamiento sh-Ngb.

**Plásmido de sobreexpresión (NGB<sup>+</sup>)** (Origene, NM\_021257): contiene la Neuroglobina humana fusionada con la proteína Myc-DDK para su detección (ver Figura 3.4).



**Figura 3.4 Esquemas de los mapas de los plásmidos Scr, sh-Ngb y Ngb<sup>+</sup>.** (A) Mapa de los plásmidos Scr y sh-Ngb donde se indica la posición donde se ha clonado la secuencia sh-RNA específica para cada caso. (B) Mapa del plásmidoNgb<sup>+</sup>.

Todos los plásmidos se amplificaron mediante la transformación de bacterias competentes de la especie *E.coli* (DH5- $\alpha$ ) y la posterior purificación del DNA plasmídico mediante un kit comercial con sistema de columnas (NucleoBond Xtra Maxi, Macherey-Nagel).

Se crearon partículas lentivirales de segunda generación para poder introducir e integrar los plásmidos mencionados en núcleo neuronal de una forma estable y duradera. Para ello se empleó, además del plásmido de interés, un plásmido de empaquetamiento (pCMV delta R 8.2, Addgene) y un plásmido de envoltura VSV-G (pMD2.G, Addgene) que codifica para las glicoproteínas del virus de estomatitis vesicular. Se empleó la línea celular HEK 293-T para empaquetar los 3 plásmidos y producir lentivirus. Para ello, se mantuvieron las células en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y cuando se encontraron a un 80% de confluencia se transfectaron con la mezcla de los 3 plásmidos preparada en OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) y utilizando polietilenimina (PEI, Sigma) en una proporción PEI:DNA 1:1. Transcurridas 12 h, el medio se reemplazó por DMEM con FBS al 2% y se mantuvieron las células a 37 °C durante 48 h más, tras lo cual se procedió al aislamiento de los lentivirus. Para ello, tras sedimentar el debris celular a 900 g durante 15 min a 4 °C, se filtró el sobrenadante con un filtro de 0,22 µm de poro y posteriormente se ultracentrifugó a 60.000 g durante 2 h a 4 °C. El *pellet* de lentivirus se resuspendió en PBS estéril y se congeló en alícuotas de un solo uso que se mantuvieron a -80 °C.

Se estimó la concentración de lentivirus, expresada en Unidades Transductoras (UT)/ml, mediante citometría de flujo. Para ello, se infectaron células HEK 293T con concentraciones crecientes de virus y se obtuvo el porcentaje de células infectadas (positivas para tGFP) transcurridas 48 h. Las 3 preparaciones de lentivirus mostraron titulaciones altas, comprendidas entre  $10^8$  y  $10^9$  UT/ml.

### 3.1.26. Infección de cultivos celulares

Los cultivos neuronales se infectaron a DIV 6 con un MOI (*multiplicity of infection*) de 5. Para ello, el día de la infección se resuspendió la cantidad de lentivirus necesaria en 200 µl de medio condicionado y se le añadió al cultivo gota a gota. Al día siguiente, se sustituyó completamente el medio por Neurobasal suplementado con B27.

### 3.1.27. Inyección de lentivirus en ratones App<sup>NL/F</sup>

Para estudiar el efecto del silenciamiento de Neuroglobina *in vivo* se inyectaron lentivirus sh-NGB en la corteza somatosensorial de ratones App<sup>NL/F</sup> de 16 meses de edad, empleando las siguientes coordenadas: Anteroposterior (Bregma): +0,11; mediolateral: ±0,15; dorsoventral: -0,18. Se inyectó el lentivirus de silenciamiento sh-NGB en un hemisferio y el *scramble* en el hemisferio contralateral del mismo ratón.



Los ratones se mantuvieron en sedación profunda mediante anestesia inhalatoria (isoflurano) durante todo el procedimiento. Se controló la pérdida de temperatura corporal con ayuda de una manta térmica y se previno la sequedad ocular mediante crema ocular hidratante.

Se fijó la cabeza del ratón al aparato de estereotaxia mediante fijaciones bucales y auriculares, y se realizaron dos agujeros en el cráneo con ayuda de un microtaladro y una broca de diámetro 1 mm. Empleando una jeringa Hamilton (Serie 700 87930, Hamilton) con una aguja de calibre 30G (7762-03, Hamilton) se inyectó 1  $\mu$ l del lentivirus correspondiente en cada hemisferio.

Al terminar la cirugía, se suturó la incisión en el cuero cabelludo con hilo quirúrgico y se aplicó crema anestésica local. El ratón se reanimó sobre una manta eléctrica y se le inyectaron 200  $\mu$ l ip para prevenir la deshidratación. Asimismo, se mantuvieron vigilados durante una semana, con analgésico (Dalsy) en el agua de bebida. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en una sala de animalario con un nivel de bioseguridad P2.

Al cabo de 2 meses, los ratones se perfundieron transcárdialmente y su cerebro se cortó en secciones, como se ha descrito anteriormente (sección 3.1.3 y 3.1.19). Con ayuda de un microscopio de fluorescencia Axiovert 200 (Zeiss) se seleccionaron los cortes con células infectadas para su posterior estudio y análisis.

## **Análisis estadístico de los datos**

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con SPSS (IBM). Para analizar el efecto de factores de dos niveles, se comprobó la normalidad de la distribución muestral mediante el test Shapiro-Wilk y se compararon las medias mediante la prueba t de Student de dos vías. En el caso de factores de más de dos niveles se empleó el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Tukey para comparar las medias entre los distintos grupos. Para estudiar el efecto de 2 factores sobre una variable estudiada, se realizó un ANOVA de dos vías para estudiar el efecto de cada uno de los factores así como la posible interacción entre ellos, y se continuó con un análisis *post-hoc* de Tukey para comparar las medias de los distintos grupos. Se consideraron significativos valores de P menores de 0,05.

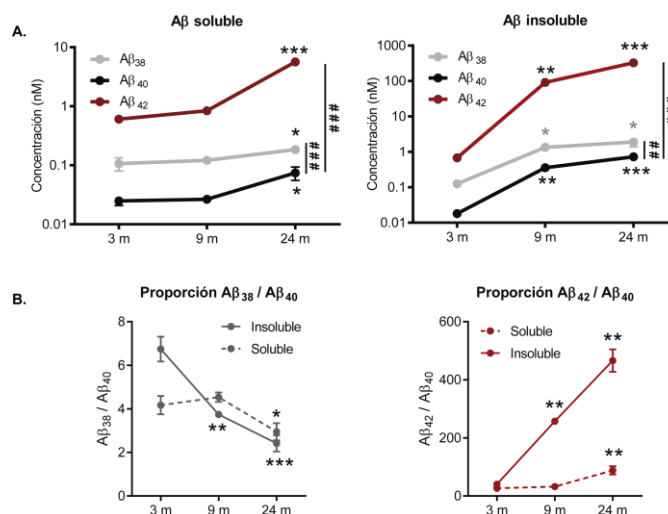
## 4. Resultados

### Los ratones App<sup>NL-F</sup> presentan algunos de los signos característicos de la enfermedad de Alzheimer

Nuestro primer objetivo consistió en definir el grado de patología de los ratones App<sup>NL-F</sup>. Para ello, realizamos diversos estudios bioquímicos e histológicos en el cerebro de estos animales y los comparamos con ratones WT de la misma edad. Debido a que la patología amiloide en la EA comienza en la corteza, decidimos centrar nuestros estudios en esta región del cerebro.

#### 4.1.1. Acumulación de especies tóxicas de A $\beta$

Las mutaciones *Swedish* e *Iberian* del modelo dan lugar a la sobreproducción de A $\beta$ , y en especial del fragmento A $\beta_{42}$  sobre el A $\beta_{40}$  (Saito et al. 2014). Sin embargo, los niveles de A $\beta_{38}$  también son relevantes en la enfermedad y no fueron descritos por los autores del modelo. En este trabajo, el análisis por inmunoensayo (MSD) en la corteza de ratones App<sup>NL-F</sup> reveló acumulación de todas las especies de A $\beta$  analizadas (A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$ ) en sus formas solubles e insolubles. Los niveles son elevados desde los 3 meses de edad y aumentan a lo largo del tiempo hasta los 24 meses de edad (Figura 4.1).



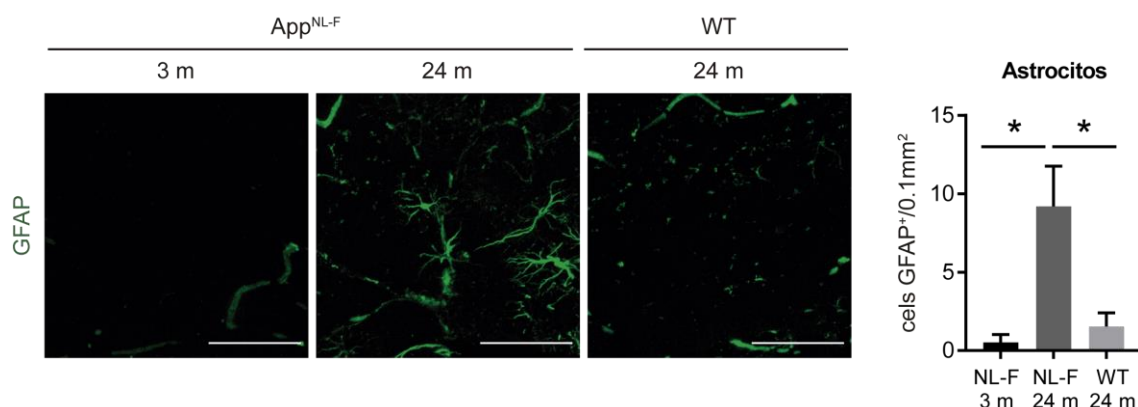
**Figura 4.1 Acumulación de fragmentos tóxicos de A $\beta$  en la corteza de ratones App<sup>NL-F</sup>.** (A) Niveles de las formas solubles e insolubles de las especies A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  en el cortex de ratones App<sup>NL-F</sup> de 3, 9 y 24 meses. (B) Progresión de la proporción A $\beta_{38}$ /A $\beta_{40}$  (izquierda) y A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  (derecha) a lo largo del tiempo. n = 4 a 6 ratones, las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía seguido de análisis *post hoc* de Tukey. \* P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs 3 meses. ## P<0.01, ####P<0.001 vs. A $\beta_{40}$ .

Además, la proporción entre las formas más tóxicas ( $A\beta_{38}$  y  $A\beta_{42}$ ) y el  $A\beta_{40}$ , es elevada en todas las edades estudiadas. Sin embargo, esta proporción va disminuyendo con la edad en el caso del  $A\beta_{38}/A\beta_{40}$  mientras que para  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  la proporción se acentúa a lo largo del tiempo (Figura 4.1).

#### 4.1.1. Neuroinflamación

Debido a la relevancia de la activación glial en el desarrollo de la enfermedad, se estudió el grado de neuroinflamación en la corteza de ratones  $App^{NL-F}$  durante el envejecimiento.

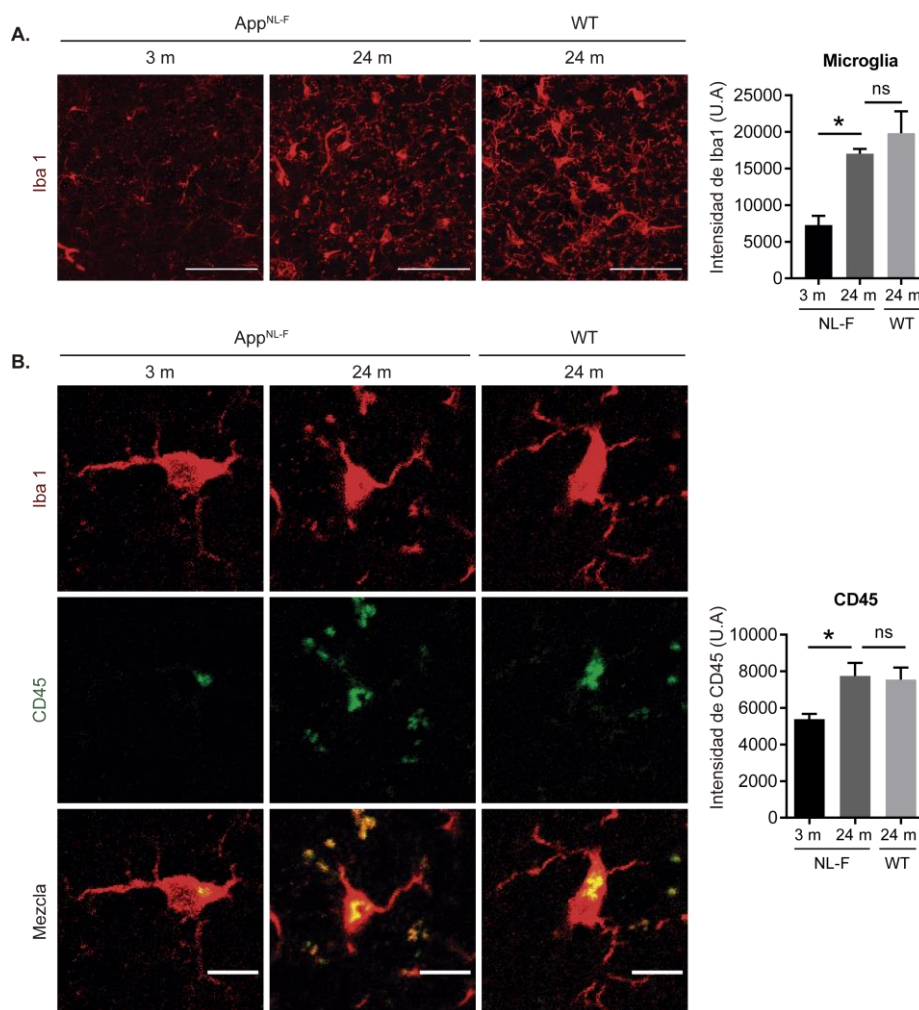
En primer lugar, analizamos el número de astrocitos, ya que se ha demostrado que este aumenta en el curso de la patología (Heneka et al. 2015). La inmunotinción para GFAP (proteína ácida fibrilar glial) mostró un aumento en el número de astrocitos corticales en los ratones  $App^{NL-F}$  a lo largo del tiempo, alcanzando un grado de astrogliosis mayor que en ratones WT de la misma edad (Figura 4.2).



**Figura 4.2 Activación astrocitaria en ratones  $App^{NL-F}$ .** Imágenes de confocal (izquierda) y su cuantificación (derecha) de inmunotinción con GFAP en la corteza de ratones  $App^{NL-F}$  de 3 y 24 meses, y WT de 24 meses.  $n = 12-16$  imágenes de 4 ratones, las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía seguido de análisis *post hoc* de Tukey, \*  $P < 0.05$ , barra de escala: 50  $\mu$ m.

Además de los astrocitos, también analizamos el nivel de actividad de las células microgliales, ya que, al igual que la astrocitosis, es una respuesta típica al aumento de  $A\beta$  en la EA y en diferentes modelos para la enfermedad (Heneka et al. 2015). Uno de los métodos convencionales para determinar el nivel de actividad de las células microgliales es a través de tinción con un anticuerpo contra la proteína Iba1 (molécula adaptadora de ión de calcio). Este estudio reveló mayor inmunoreactividad en los ratones  $App^{NL-F}$  viejos comparados con animales jóvenes. Sin embargo, se observaron niveles similares de intensidad de

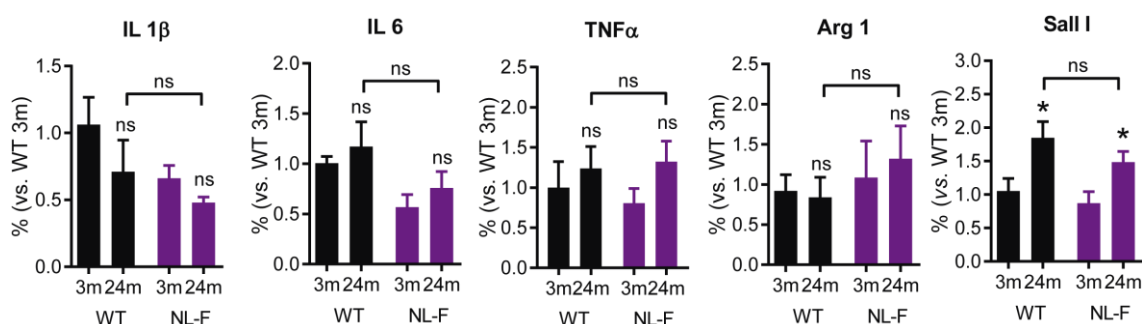
fluorescencia en ratones WT viejos (Figura 4.3A). Estos resultados indicadores de una activación microglial asociada a la edad fueron confirmados mediante inmunotinción con CD45 (receptor de fosfatasa tirosina), presente en la superficie de la microglía y cuya expresión aumenta cuando estas células se encuentran activadas (Grabert et al. 2016). Como se observa en la Figura 4.3B, la microglía de ratones  $App^{NL-F}$  viejos expresan más CD45 que animales más jóvenes, pero presentan niveles similares a los observados en ratones WT de la misma edad.



**Figura 4.3 Activación microglial en ratones  $App^{NL-F}$ .** Imágenes de confocal representativas (izquierda) y su cuantificación (derecha) de (A) inmunotinción con Iba 1 o (B) doble inmunotinción con Iba 1 y CD45 en la corteza de ratones  $App^{NL-F}$  de 3 y 24 meses, y WT de 24 meses.  $n = 12-16$  imágenes de 4-6 ratones, las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía seguido de análisis *post hoc* de Tukey, \*  $P < 0.05$ , ns: no significativo, barra de escala: 50  $\mu$ m (A) o 10  $\mu$ m (B).

Con el objetivo de determinar la existencia de cambios moleculares asociados a procesos inflamatorios derivados del genotipo y aumento de expresión de especies tóxicas de

Abeta, procedí a investigar a continuación el perfil neuroinflamatorio de ratones App<sup>NL-F</sup> y WT mediante qRT PCR. Para ello, se analizó la regulación transcripcional de genes de diferentes citoquinas con una gran relevancia en la EA por su contribución a la neuroinflamación crónica. La transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias (IL 1 $\beta$ , IL 6 y TNF $\alpha$ ) no incrementa con la edad en ratones App<sup>NL-F</sup> ni en WT, mostrando además niveles parecidos entre ambos genotipos (Figura 4.4). Del mismo modo, los niveles de Arg-1 (citoquina antiinflamatoria) son similares en todos los grupos estudiados (Figura 4.4). Por último, se analizaron los niveles de Sall I (factor de transcripción tipo Spalt 1), gen que se expresa exclusivamente en células microgliales. Como se observa en la Figura 4.4, su transcripción aumenta con la edad en ratones App<sup>NL-F</sup> así como en ratones WT, alcanzando niveles similares entre ellos a los 24 meses de edad.



**Figura 4.4 Análisis por qRT -PCR de citoquinas inflamatorias.** Niveles de ARN<sub>m</sub> de las diferentes citoquinas inflamatorias en la corteza de ratones App<sup>NL-F</sup> y WT a los 3 y 24 meses de edad. n = 4 ratones, las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía seguido de análisis *post hoc* de Tukey, \* P<0.05 vs. 3m, ns: no significativo.

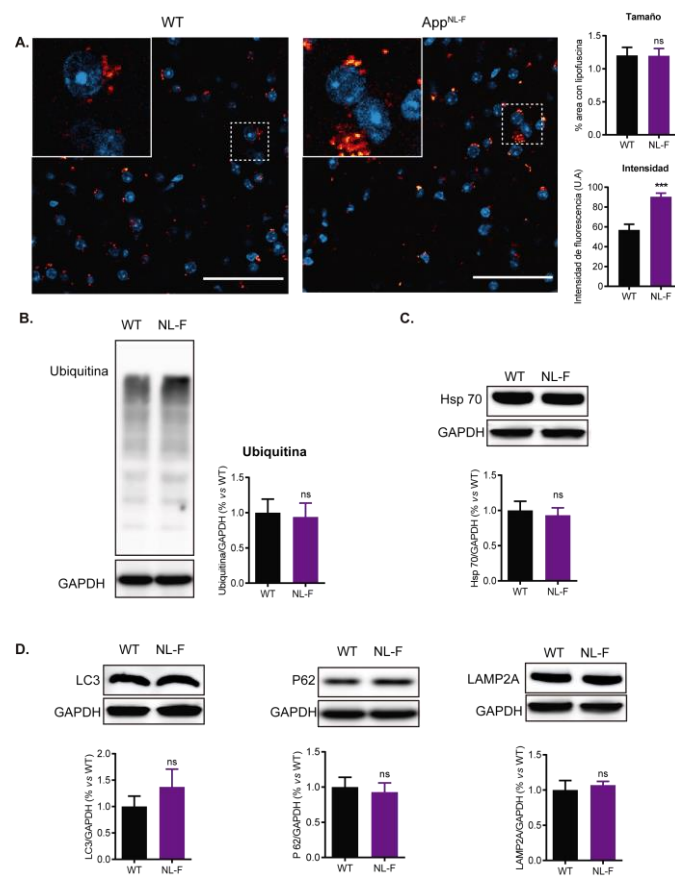
#### 4.1.2. Estrés celular

A continuación, se estudió el grado de estrés celular mediante el análisis de los gránulos de lipofuscina en rodajas corticales de ratones de 24 meses de edad. Durante el proceso fisiológico de envejecimiento, y de forma más acusada durante la EA, se produce una alteración de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la proteostasis celular, que conduce a la formación de agregados perinucleares autofluorescentes con alto contenido lipídico (Moreno-Garcia et al. 2018).

Como puede observarse en la Figura 4.5A, las rodajas de corteza de los ratones App<sup>NL-F</sup> de 24 meses presentan gránulos perinucleares más intensos que aquellos de ratones WT de la misma edad. No obstante, el tamaño de los mismos es similar en los dos casos.

Para intentar explicar el aumento en la acumulación de lipofuscina, se analizaron algunos de los sistemas más importantes encargados de mantener la proteostasis celular y cuya función se ha visto alterada en modelos de exceso de péptido amiloide (Oddo et al. 2008): el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP), el plegamiento mediado por chaperonas y la autofagia.

En primer lugar, el grado de ubiquitinación de las proteínas en el cortex de ratones App<sup>NL-F</sup> de 24 meses de edad resultó ser el mismo que en WT de la misma edad, no pareciendo existir una acumulación de proteínas ubiquitinadas (Figura 4.5B).



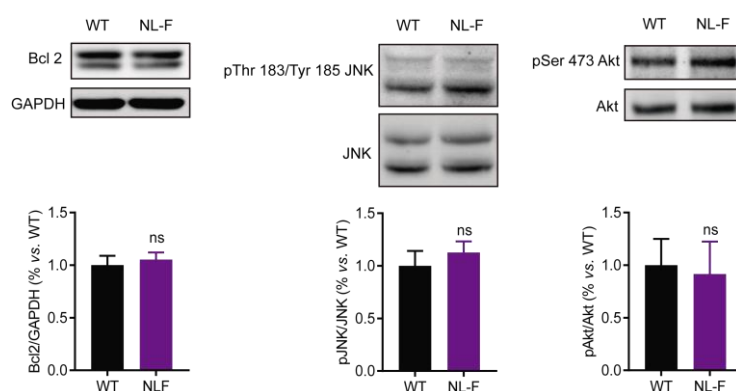
**Figura 4.5 Acumulación de lipofuscina y análisis de la proteostasis celular en ratones de 24 meses.** (A) Imágenes de confocal representativas (izquierda) de gránulos de lipofuscina en rodajas corticales de ratones WT y App<sup>NL-F</sup> y su cuantificación (derecha) n = 12 rodajas de 3 ratones de cada genotipo. Análisis por western blot del nivel de (B) ubiquitinación de proteínas y de expresión de (C) la chaperona Hsp 70 y (D) de las proteínas implicadas en el proceso de autofagia LC3, p62 y LAMP2A en extracto cortical de ratones WT y App<sup>NL-F</sup>. n = 5-7 ratones de cada genotipo. Las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, t de Student de dos vías, \*\*\* P<0.001, ns: no significativo, vs WT. barra de escala: 50  $\mu$ m

En segundo lugar, se analizó la expresión de la proteína de choque térmico de 70 KDa (Hsp-70), cuya expresión está reducida en la EA (R. C. Lu et al. 2014b). Sin embargo, no

encontramos que los niveles de Hsp-70 estuvieran disminuidos en los ratones  $App^{NL-F}$  comparados con ratones WT, tanto en animales jóvenes como en los viejos (Figura 4.5C).

En relación al estudio de la autofagia, se analizaron dos de las principales vías autofágicas, la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA de sus siglas en ingles). La macroautofagia consiste en el crecimiento de una doble membrana (fagoforo) que rodea aquellas estructuras destinadas a ser degradadas, para lo cual se reclutan la proteína LC3 y P62. Estas dos proteínas son degradadas tras la fusión del autofagosoma con los lisosomas, de forma que un aumento de sus niveles podría indicar un déficit de la vía macroautofágica. El análisis de la expresión de LC3 y P62 no reveló diferencias significativas entre ratones WT y  $App^{NL-F}$  de 24 meses (Figura 4.5D). Por último, durante la CMA las proteínas reconocidas por las correspondientes chaperonas son translocadas al lumen del lisosoma mediante el complejo multimérico formado por LAMP2A. Cambios en los niveles de LAMP2A en la membrana del lisosoma modula la actividad de la CMA. Sin embargo, los niveles de LAMP2A no aparecen reducidos en los ratones  $App^{NL-F}$  comparados con ratones WT (Figura 4.5D).

Con el fin de estudiar si la acumulación de lipofusina en estos ratones es suficiente para activar los mecanismos de citotoxicidad, se analizaron las rutas moleculares proapoptóticas que normalmente se encuentran activadas en procesos de disfunción proteasomal (Powell et al. 2005). Como se puede observar en la Figura 4.6, la expresión de la proteína proapoptótica Bcl-2 no aumenta en los ratones  $App^{NL-F}$  en comparación con los WT a edades tempranas ni en animales envejecidos.



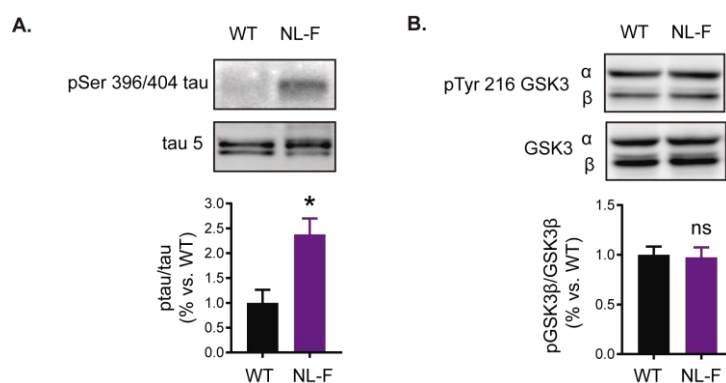
**Figura 4.6 Ausencia de activación de las vías de supervivencia en ratones  $App^{NL-F}$  de 24 meses.** Detección por western blot de los niveles de Bcl 2 y de las marcas activadoras de JNK (fosfo Thr 183/Tyr 185) y Akt (fosfo Ser 473) en extracto cortical de ratones WT y  $App^{NL-F}$ . n = 5 ratones de cada genotipo. Las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, t de Student de dos vías, ns: no significativo, vs WT.



Del mismo modo, la quinasa c-Jun-N-terminal (JNK) en los ratones App<sup>NL-F</sup> no muestra, en ningún caso, una activación por fosforilación mayor que en los animales WT de la misma edad (Figura 4.6). También se estudió la activación de la ruta pro-supervivencia PI3K (fosfatidil inositol 3 kinasa)-Akt. El análisis de la activación de Akt reveló niveles de fosforilación similares entre los ratones WT y los App<sup>NL-F</sup>, independientemente de la edad (Figura 4.6).

#### 4.1.3. Fosforilación de tau

A continuación, se estudió el grado de hiperfosforilación de tau en el epítipo PHF1 (Ser 396/Ser 404), ya que es un residuo que únicamente se fosforila durante la EA y está directamente relacionado con la desestabilización de los microtúbulos y la formación de filamentos helicoidales pareados (PHF), (Hanger et al. 1998; Noel et al. 2016). Como se observa en la Figura 4.7, a los 24 meses de edad la proteína tau está más fosforilada en los ratones App<sup>NL-F</sup> que en WT, en comparación con los niveles totales de la proteína. Dado que la activación de la quinasa glucógeno sintasa 3  $\beta$  (GSK3  $\beta$ ) es una de las principales vías responsables de la fosforilación de tau inducida por A $\beta$  (Noel et al. 2016), se analizó su activación por fosforilación en el residuo Tyr216. Sorprendentemente, la activación de GSK3  $\beta$  en ratones App<sup>NL-F</sup> no fue mayor que en ratones WT de la misma edad (Figura 4.7).



**Figura 4.7 Fosforilación de tau y análisis de la activación de GSK3  $\beta$ .** Western blot de (A) la fosforilación de tau en el epítipo PHF 1 (fosfo Ser 396/Ser 404) y (B) de la marca de activación de GSK3  $\beta$  (fosfo Tyr 216) involucrada en la fosforilación de tau. n = 5 ratones, las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, prueba t de Student, \* P<0.05, ns: no significativo, *vs* WT.

### Los ratones App<sup>NL-F</sup> no muestran alteraciones funcionales

Hasta el momento, se ha demostrado que los ratones App<sup>NL-F</sup> presentan ciertos signos histopatológicos y bioquímicos característicos de la enfermedad de Alzheimer: sobreproducción y acumulación de A $\beta$ , activación astrocitaria e hiperfosforilación de tau,

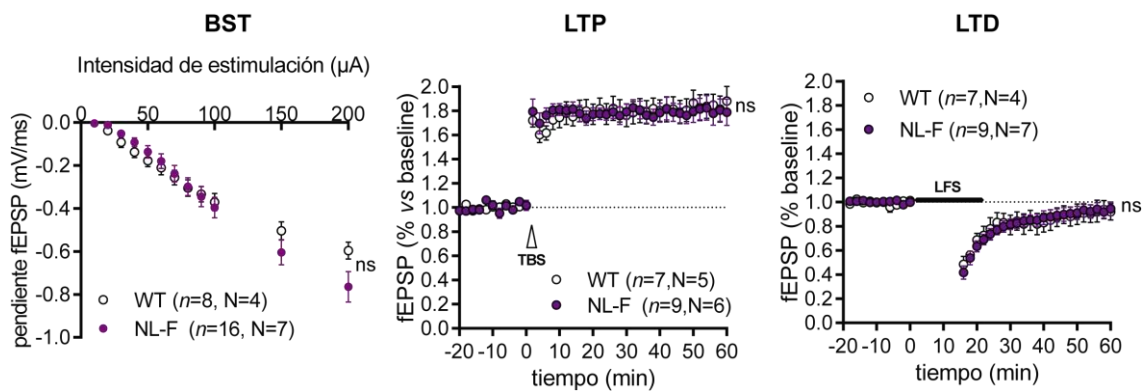


además de mostrar otros signos de estrés celular como acumulación de gránulos de lipofusina. Dado que dichas alteraciones se han asociado con efectos nocivos para las neuronas, nos propusimos a continuación evaluar el grado de alteración funcional que podría haber derivado de las mismas.

#### 4.1.4. Plasticidad sináptica normal

En primer lugar, se analizó la plasticidad neuronal en el circuito hipocampal de ratones App<sup>NL-F</sup> y WT, para lo cual se emplearon rodajas de animales de 21 meses de edad. En primer lugar, se estudió si existían diferencias en la transmisión sináptica basal (BST) entre ambos genotipos. Como puede observarse en la Figura 4.8, la estimulación a diferentes intensidades produjo potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) de una amplitud parecida en rodajas de App<sup>NL-F</sup> y WT.

A continuación, se estudió la plasticidad neuronal en el circuito hipocampal de estos ratones, para lo cual se indujo potenciación a largo plazo (LTP) mediante estimulación en ráfaga *theta* (TBS). En primer lugar, se observó una inducción de LTP en las rodajas de animales WT, que se mantuvo estable transcurridos 60 min (Figura 4.8). Del mismo modo, la inducción de LTP en rodajas de App<sup>NL-F</sup> fue igualmente eficaz y estable, produciendo una respuesta comparable a la de animales WT (Figura 4.8).



**Figura 4.8 Las rodajas hipocampales de ratones App<sup>NL-F</sup> de 21 meses muestran una plasticidad sináptica similar a las de ratones WT.** Gráficas de la transmisión sináptica basal (izquierda) y de la inducción de LTP mediante estimulación en ráfaga *theta* (TBS) (centro) y de LTP por estimulación a baja frecuencia (LFS) (derecha) de rodajas hipocampales de ratones WT y App<sup>NL-F</sup>. Se define el número *n* de rodajas empleadas de *N* animales de cada genotipo. Las gráficas muestran la media  $\pm$  SEM, *t* de Student de dos vías, ns: no significativo, *vs* WT.

De manera similar, el estudio de la depresión a largo plazo (LTD) mediante estimulación a baja frecuencia (LFS) produjo una depresión postsináptica de magnitud comparable en ratones WT y App<sup>NL-F</sup> (Figura 4.8).

En conclusión, el circuito hipocampal de los ratones App<sup>NL-F</sup> presenta una plasticidad neuronal fisiológica, siendo capaz de generar respuestas de LTP y LTD comparables a las de ratones WT de la misma edad.

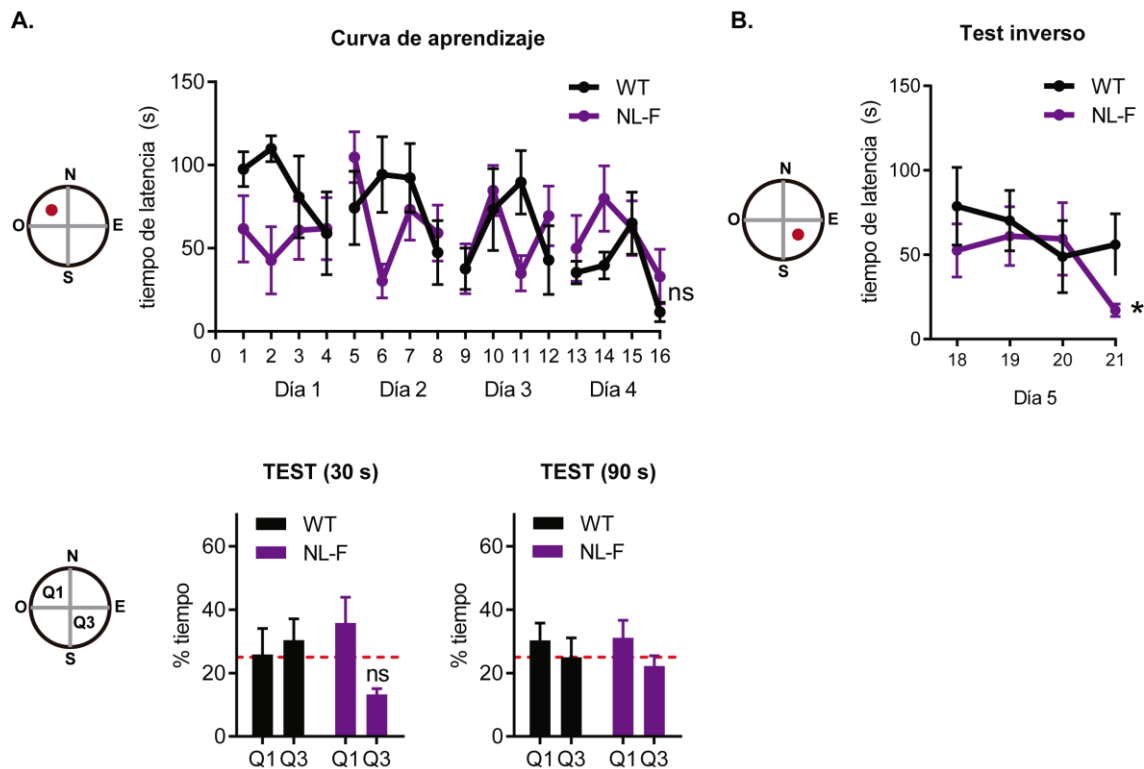
#### **4.1.5. Ausencia de déficits de aprendizaje y pérdida de memoria**

Los ratones App<sup>NL-F</sup>, de acuerdo con los autores del modelo, muestran una leve alteración de la memoria a los 18 meses de edad, valorada mediante el laberinto en Y (Saito et al. 2014). Con el fin de profundizar en el estado cognitivo de estos ratones, se analizaron la capacidad de aprendizaje y memoria en animales de 21 meses de edad, empleando para ello paradigmas comportamentales de gran relevancia en el campo de la neurociencia: el laberinto acuático de Morris y la prueba de condicionamiento al miedo.

Los ratones WT de 21 meses de edad aprendieron a orientarse en el laberinto acuático de Morris, como puede observarse en la curva de aprendizaje, mostrando el cuarto día una latencia de 10 s para encontrar la plataforma (Figura 4.9A). Sin embargo, los ratones App<sup>NL-F</sup> mostraron un aprendizaje similar, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

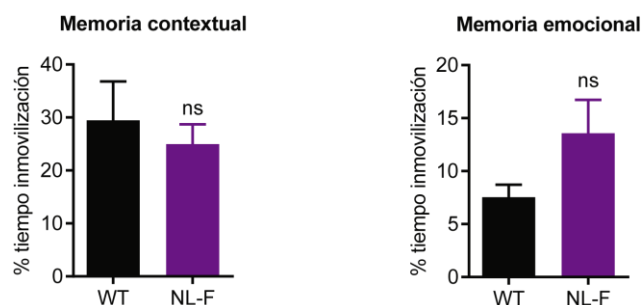
El día del test se analizó el porcentaje de tiempo que los ratones estuvieron nadando en el cuadrante diana (Q1) y el cuadrante opuesto (Q3). Durante los 30 primeros segundos, cuando los ratones muestran mayor motivación, ninguno de los grupos pasó más tiempo buscando la plataforma en el Q1, aunque se observó una tendencia de los ratones App<sup>NL-F</sup> a pasar más tiempo en este cuadrante (Figura 4.9A). Al analizar los 90 s de duración del test, la tendencia observada durante los 30 s iniciales se mantuvo; tanto los ratones WT como App<sup>NL-F</sup> nadaron en Q1 y Q3 durante el mismo tiempo, si bien los animales App<sup>NL-F</sup> mantuvieron la tendencia a pasar más tiempo en Q1 (Figura 4.9A).

En la prueba de aprendizaje inverso, los ratones App<sup>NL-F</sup> aprendieron durante en 4 sesiones la nueva localización de la plataforma, como puede deducirse por la reducción del tiempo de latencia. Sin embargo, los ratones WT no aprendieron a encontrar la plataforma (Figura 4.9B).



**Figura 4.9 Los ratones App<sup>NL-F</sup> no muestran alteraciones en el aprendizaje a los 21 meses de edad en la prueba del laberinto acuático de Morris.** (A) Representación gráfica del tiempo de latencia hasta la plataforma invisible en ratones App<sup>NL-F</sup> y WT durante la fase de aprendizaje del laberinto acuático de Morris (arriba) y análisis del porcentaje de tiempo de nado en el cuadrante diana (Q1) y el cuadrante opuesto (Q3) el día del test, en el cual la plataforma se ha retirado de la piscina (abajo). (B) Curva de aprendizaje inverso, en el que la plataforma sumergida se ha cambiado de posición.  $n = 5$  (WT) u  $8$  (App<sup>NL-F</sup>) ratones. Las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM,  $t$  de Student de muestras repetidas para las curvas de aprendizaje,  $t$  de Student de dos vías para el test de memoria. \*  $P < 0.05$ , ns: no significativo, *vs* WT.

La prueba de condicionamiento al miedo demostró que tanto los animales WT como App<sup>NL-F</sup> presentan una memoria contextual comparable, puesto que ambos grupos mostraron un comportamiento de inmovilización cuando fueron expuestos al contexto asociado a las descargas eléctricas (Figura 4.10). La memoria emocional, evaluada durante el tercer día de la prueba, reveló que no existen diferencias en la memoria dependiente de amígdala, puesto que ambos grupos de ratones mostraron un comportamiento de inmovilización bajo cuando fueron expuestos al tono (Figura 4.10).



**Figura 4.10 Los ratones App<sup>NL-F</sup> de 21 meses no presentan déficits de memoria contextual o emocional a los 21 meses de edad en la prueba de condicionamiento al miedo.** Representación gráfica del porcentaje de tiempo de inmovilización de ratones App<sup>NL-F</sup> y WT durante la exposición al contexto relacionado con el estímulo aversivo (izquierda) o al tono (derecha).  $n = 5$  (WT) u  $8$  (App<sup>NL-F</sup>) ratones. Se representa la media  $\pm$ SEM,  $t$  de Student de dos vías, ns: no significativo, *vs* WT.

En conjunto, las pruebas de comportamiento no revelaron ninguna diferencia en la capacidad de memoria y aprendizaje entre los ratones WT y App<sup>NL-F</sup> de 21 meses de edad.

### **La neuroglobina está sobreexpresada en el cortex de ratones App<sup>NL-F</sup>**

Las alteraciones bioquímicas e histológicas observadas en este modelo, a pesar de ser consideradas como tóxicas para las neuronas, no fueron suficientes para inducir una alteración funcional, en términos de disfunción sináptica o declive cognitivo. Una interpretación posible a la falta de déficit funcional estaría dada por la intensidad sub-umbral de formas tóxicas del péptido para la producción de defectos funcionales o a la exposición por períodos de tiempo reducidos comparados con los que se observan en humanos, que pueden ser de más de 10 años. Alternativamente, la falta de déficit funcional podría deberse a la represión de proteínas involucradas en vías de apoptosis o, por el contrario, en la sobre activación de proteínas involucradas en vías de supervivencia. Para testar estas posibilidades, estudiamos a continuación la expresión de genes involucrados en rutas de toxicidad y supervivencia.

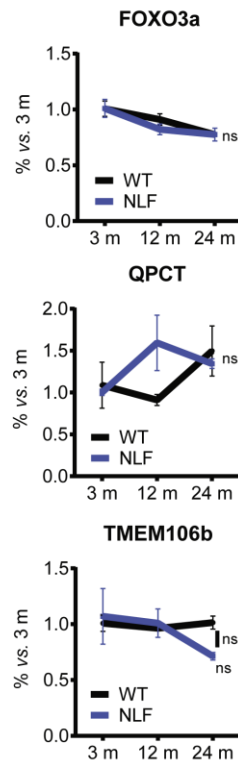
#### **4.1.6. Análisis de genes de supervivencia**

Como primera aproximación, se realizó una revisión bibliográfica sobre genes relacionados con rutas de toxicidad y supervivencia neuronal y cuya expresión en pacientes con EA estuviera incrementada (toxicidad) o reprimida (genes protectores) (Figura 4.11A). A continuación, se analizó por qRT-PCR la expresión de dichos genes a lo largo del tiempo en el córtex de ratones WT y App<sup>NL-F</sup> de 3, 12 y 24 meses de edad.

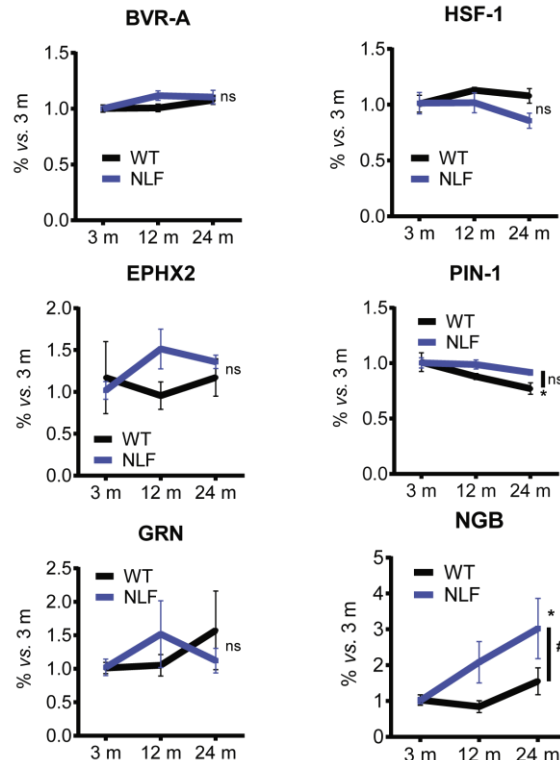
A.

	Gen	Proteína	Función
TOXICIDAD	FOXO3a	Proteína <i>forkhead box</i> O3	Estrés oxidativo
	QPCT	Glutaminil ciclotransferasa	Agregación Aβ
	TMEM106b	Proteína transmembrana 106 b	Tráfico lisosomal
PROTECCIÓN	BLVRA	Biliverdina reductasa A	Señalización de insulina
	EPHX2	Epóxido hidrolasa 2	Inflamación
	GRN	Progranulina	Tráfico lisosomal
	HSF-1	Factor de transcripción de choque térmico 1	Plegamiento de proteínas
	PIN-1	Peptidil-propil ci-trans isomerasa	Plegamiento de proteínas
	NGB	Neuroglobina	Estrés oxidativo

B.



C.



**Figura 4.11 Análisis de la activación de genes de toxicidad o supervivencia durante la EA en la corteza de ratones WT y App<sup>NL-F</sup> a lo largo del tiempo.** (A) Resumen de los genes seleccionados y agrupados según su función en procesos de toxicidad o supervivencia. Análisis por qRT-PCR de los genes relacionados con toxicidad en la EA (B) o supervivencia (C) en el córtex de ratones WT y App<sup>NL-F</sup> a los 3, 12 o 24 meses de edad. Nótese que NGB es el único gen cuya expresión aumenta en ratones App<sup>NL-F</sup> a lo largo del tiempo. n=4 ratones de cada genotipo. Se representa la media  $\pm$ SEM, ANOVA de dos vías (genotipo, edad), sin interacción, seguido de análisis *post hoc* de Tukey, \* P<0.05 vs 3m, #P<0.05 vs WT. ns: no significativo.

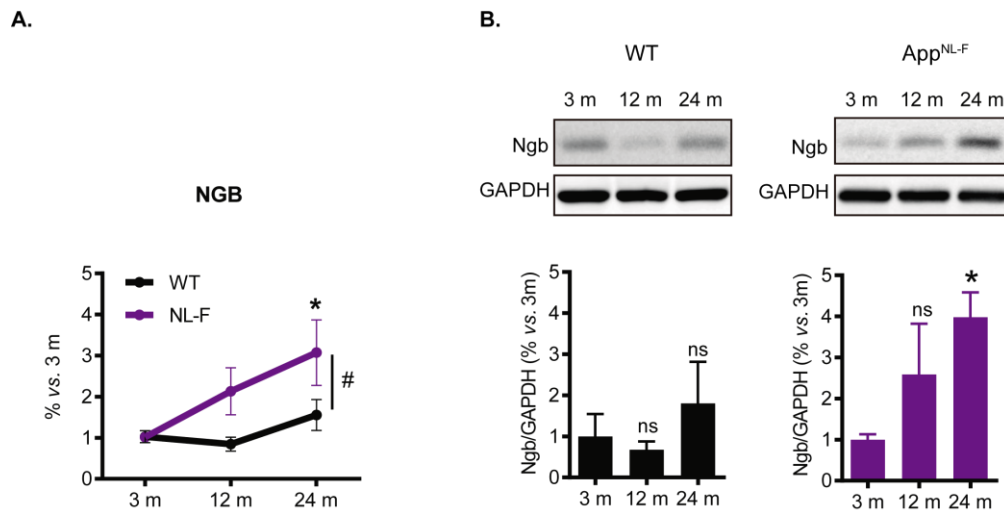
El análisis de la expresión de genes perjudiciales, esto es, genes que presentan un papel establecido en toxicidad celular, y cuyos niveles están elevados en pacientes con EA, no reveló cambios significativos a lo largo del tiempo en ratones App<sup>NL-F</sup>. Los genes FOXO3a (*Forkhead Box* O3), QPCT (glutaminil ciclotransferasa) o TMEM106b (proteína de transmembrana 106 b)(Figura 4.11B), todos con niveles aumentados en cerebros de individuos afectados por EA, no aparecieron reducidos en ratones App<sup>NL-F</sup>, en principio

descartando la posibilidad de que la falta de defectos cognitivos fuera debida a una reducción en vías de toxicidad. Los ratones WT mostraron los mismos niveles de los genes estudiados a lo largo del tiempo (Figura 4.11B).

En segundo lugar, se analizaron los niveles de expresión de genes con un papel establecido en vías de supervivencia celular y cuya expresión está disminuida en pacientes con EA. Como puede observarse en la Figura 4.11C, la expresión de ninguno de los susodichos genes de supervivencia estudiados disminuyó en los ratones  $App^{NL-F}$  a lo largo del tiempo. Por otro lado, observamos que la expresión del gen NGB (neuroglobina) aumentó significativamente en el cortex de estos ratones a los 24 meses de edad, mostrando un incremento del 300% respecto a animales de 3 meses. Cabe destacar que estos niveles fueron superiores a los mostrados por ratones WT de la misma edad (Figura 4.11C).

#### 4.1.7. Expresión de proteína

A continuación, se estudió si el aumento en la transcripción del gen NGB (Figura 4.12A) era correspondido con un incremento en los niveles de la proteína, para lo cual se analizó la expresión de neuroglobina por western blot en ratones  $App^{NL-F}$  y WT a las edades mencionadas anteriormente.



**Figura 4.12 La transcripción y expresión de Ngb aumentan en el córtex de ratones  $App^{NL-F}$ .** (A) Representación de los niveles de  $ARN_m$  de NGB analizados por qRT-PCR.  $n=4$  ratones de cada genotipo. Las gráficas representan la media  $\pm$ SEM, ANOVA de dos vías (genotipo, edad), sin interacción, seguido de análisis *post hoc* de Tukey, \*  $P<0.05$  vs 3m, # $P<0.05$  vs WT. (B) Análisis por western blot de los niveles de Ngb en extracto de corteza de ratones WT y  $App^{NL-F}$  de 3, 12 y 24 meses de edad.  $n=4$  ratones de cada genotipo. ANOVA de una vía seguido de análisis *post-hoc* de Tukey, \* $P<0.05$  vs 3m, ns: no significativo vs 3m.

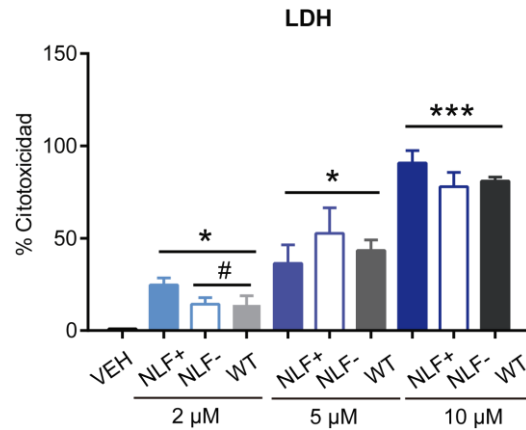
Consecuentemente con el aumento de la transcripción del gen NGB, los niveles de expresión de la proteína también aumentaron progresivamente con la edad en los ratones App<sup>NL-F</sup>, mientras que se mantuvieron constantes en el caso de los ratones WT (Figura 4.12B).

## **La acumulación de ROS en ratones App<sup>NL-F</sup> induce la expresión de Neuroglobina**

El aumento de los niveles de Ngb en los ratones App<sup>NL-F</sup> puede deberse a la acción de múltiples factores. Sin embargo, dada la estrecha relación entre la expresión de Ngb y el estado oxidativo de la célula, investigamos la posibilidad de que el estrés oxidativo inducido por el A $\beta$  pudiera estar aumentando su expresión en estos ratones.

### **4.1.1.El tratamiento de neuronas WT con A $\beta$ <sub>42</sub> sintético aumenta la expresión de Ngb mediante mecanismos dependientes de estrés oxidativo**

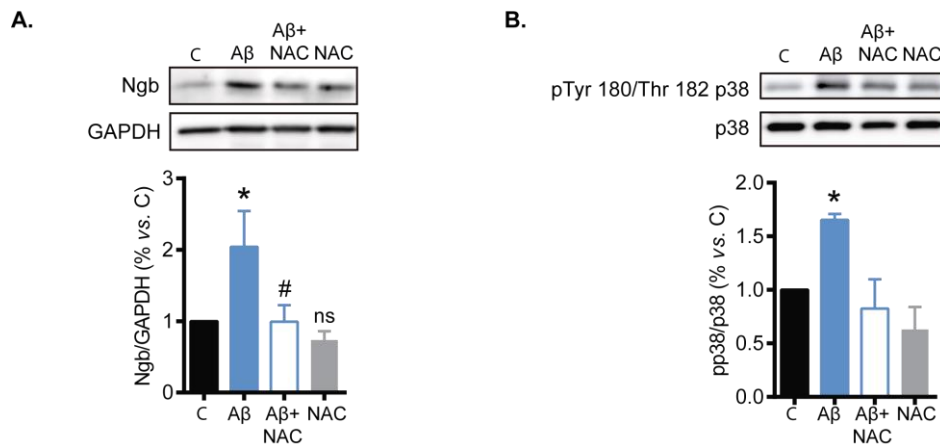
En primer lugar, decidimos purificar A $\beta$  de ratones App<sup>NL-F</sup> para estudiar el efecto del péptido producido *in situ* sobre la expresión de Ngb *in vitro*. Para ello, se trataron neuronas corticales de WT en cultivo con distintas concentraciones de extracto de corteza cerebral de ratones App<sup>NL-F</sup> de 20 meses de edad (NLF+). En esta fracción se encuentra el A $\beta$  soluble (incluyendo los oligómeros, considerados los agregados más neurotóxicos del A $\beta$ ). Como control del péptido, se utilizó el mismo extracto depletado de A $\beta$  (NLF-) mediante inmunoprecipitación, y como control de los demás factores presentes en el extracto, se empleó extracto de animales WT (WT). Previo al estudio del efecto sobre Ngb estudiamos el posible efecto tóxico de diferentes concentraciones de extracto, ya que está bien documentado que este tipo de extractos son tóxicos cuando son agregados directamente sobre células en cultivo. A través de dicho estudio se comprobó que, efectivamente, todos los tratamientos resultaron ser altamente tóxicos para las neuronas (Figura 4.13). Las concentraciones de 5 y 10  $\mu$ M produjeron una toxicidad entre el 40 y el 80%, respectivamente, independientemente del tipo de extracto empleado. Para la concentración más baja, 2  $\mu$ M, el extracto de App<sup>NL-F</sup> produjo una toxicidad del 25%, significativamente mayor a la toxicidad producida por el extracto de App<sup>NL-F</sup> inmunodepletado o de los animales WT. Sin embargo, incluso los tratamientos menos tóxicos (NLF- y WT), indujeron una toxicidad significativa (15%) sobre las neuronas en comparación con el tratamiento con vehículo (1%)(Figura 4.13).



**Figura 4.13 El tratamiento de neuronas WT con extracto de corteza de ratones  $App^{NLF}$  resulta altamente tóxico transcurridas 24 h.** Análisis por LDH de la toxicidad de los extractos NLF+, NLF- y WT a las concentraciones de 2, 5 y 10  $\mu$ M.  $n=4$  cultivos independientes. La gráfica representa el porcentaje de toxicidad *vs* el tratamiento con vehículo. ANOVA de una vía seguido de análisis *post-hoc* de Tukey. \*  $P<0,05$  *vs* VEH, \*\*\*  $P<0,001$  *vs* VEH, #  $P<0,05$  *vs* NLF+.

Estos resultados nos llevaron a descartar este procedimiento como modo de analizar el efecto sobre Ngf y procedimos a emplear  $A\beta_{42}$  sintético de humano para tratar neuronas de ratones WT en cultivo.

El tratamiento con  $A\beta_{42}$  a 5  $\mu$ M indujo un incremento en la expresión de Ngf al cabo de 24 h (Figura 4.14A).



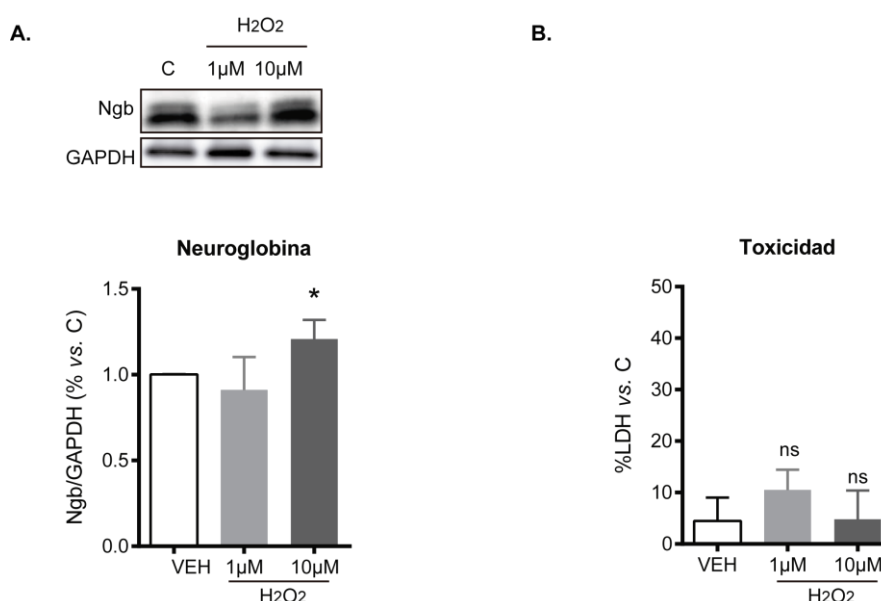
**Figura 4.14 El tratamiento con  $A\beta_{42}$  sintético aumenta la expresión de Ngf en neuronas WT al cabo de 24 h.** (A) Análisis por western blot de los niveles de expresión de Ngf tras el tratamiento con  $A\beta_{42}$  5  $\mu$ M y el pretratamiento o no con NAC 2 mM. (B) Western blot de la marca de activación de p38 (fosfo Tyr 180/Thr 182) tras el tratamiento con  $A\beta_{42}$  5  $\mu$ M y su disminución con el pretratamiento con NAC 2 mM.  $n=6$  cultivos independientes. Se representa la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* de Tukey, \*  $P<0,05$  *vs* C, #  $P<0,05$  *vs* Aβ, ns: no significativo



Para estudiar si este aumento está mediado por el estrés oxidativo inducido por A $\beta$ , se trataron las neuronas con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) a 2 mM 2 h antes del tratamiento con A $\beta$ . Como puede observarse en el panel A, el pretratamiento con NAC fue suficiente para prevenir el incremento de Ngb inducido por A $\beta$ . Se analizó la fosforilación de p38 en sus residuos Tyr 180/Thr 182 tras los distintos tratamientos, por ser una vía que se encuentra activada en condiciones de estrés oxidativo. Como se observa en el panel B de la Figura 4.14, el estrés oxidativo inducido por el A $\beta$  es bloqueado eficientemente mediante el tratamiento con NAC.

#### 4.1.1. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa los niveles de Ngb en neuronas WT

A continuación, se estudió la capacidad de los ROS para inducir la expresión de Ngb. Para ello, se trataron cultivos neuronales corticales de animales WT con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se valoró la expresión de Ngb transcurridas 24 h. Como puede observarse en la Figura 4.15, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M aumentó significativamente la expresión de Ngb al cabo de 24 h. El análisis de la toxicidad de los tratamientos por LDH reveló que ninguno de los tratamientos resultaba tóxico para las neuronas (Figura 4.15B).

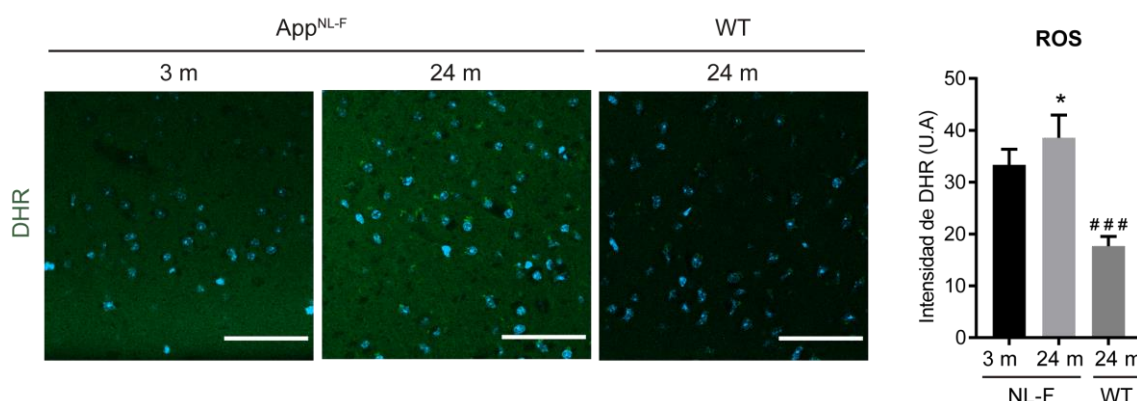


**Figura 4.15 El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M aumenta la expresión de Ngb en neuronas WT al cabo de 24 h.** (A) Análisis por western blot de los niveles de Ngb tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Estudio de la toxicidad de los tratamientos mediante LDH. n=4-6 cultivos independientes. Las gráficas representan la media  $\pm$ SEM. ANOVA de una vía seguido de análisis *post-hoc* de Tukey, \*P<0,05 vs VEH, ns: no significativo.

#### 4.1.2. Acumulación de ROS en el cortex de ratones App<sup>NL-F</sup>

Por último, analizamos el estado de estrés oxidativo en los ratones App<sup>NL-F</sup>, ya que la capacidad del A $\beta$  para inducir estrés oxidativo ha sido ampliamente demostrada (Sultana et

al. 2006). Para ello, estudiamos los niveles de ROS en rodajas corticales de App<sup>NL-F</sup> de 3 y 24 meses de edad, y de ratones WT de 24 meses de edad. Como puede observarse en la Figura 4.16, los niveles de ROS, medidos por la intensidad de fluorescencia de DHR, aumentan significativamente con la edad en la corteza de los ratones App<sup>NL-F</sup>. Además, esta acumulación no se debe exclusivamente al envejecimiento, pues los ratones WT de la misma edad acumulan una cantidad de ROS mucho menor (Figura 4.16). Por otro lado, los niveles de ROS en los ratones App<sup>NL-F</sup> ya están elevados a los 3 meses de edad, en consonancia con los niveles elevados de A $\beta$ <sub>42</sub> a esta edad (ver Figura 4.1).



**Figura 4.16 Los ratones App<sup>NL-F</sup> acumulan ROS en la corteza.** Imágenes de confocal representativas (izquierda) y su análisis (derecha) de la tinción de ROS mediante marcaje con DHR en rodajas corticales de ratones App<sup>NL-F</sup> de 3 y 24 meses, y de WT de 24 meses de edad. n=12-14 rodajas de 3 ratones de cada grupo. La gráfica representa la media  $\pm$ SEM. ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* de Tukey, \*P<0,05 *vs* NL-F 3m, ###P<0,001 *vs* NL-F 24m. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

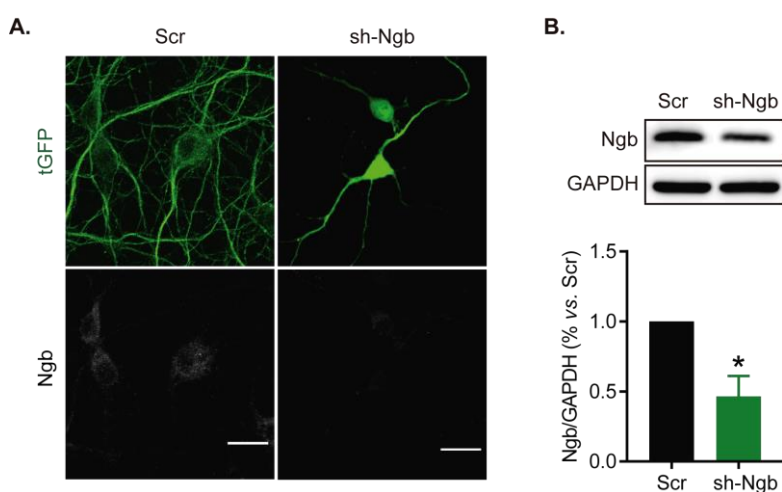
## La Neuroglobina previene las alteraciones morfológicas neuronales inducidas por A $\beta$

Como ya hemos demostrado, los ratones App<sup>NL-F</sup> no presentan alteraciones funcionales con el envejecimiento, a pesar de acumular grandes cantidades de A $\beta$  en el cerebro. También hemos demostrado que la transcripción y expresión de Ngb en el córtex de estos animales aumenta de manera muy significativa a lo largo del tiempo y que dicha expresión está mediada, al menos en parte, por la generación de ROS debido al exceso de péptido amiloide. Todo lo anterior nos llevó a especular sobre el papel neuroprotector que esta proteína podría estar ejerciendo sobre las neuronas de los ratones App<sup>NL-F</sup>, impidiendo la aparición de un fenotipo de tipo Alzheimer.

Para explorar esta posibilidad, en primer lugar, se llevaron a cabo experimentos de pérdida de función en los que se silenció la expresión de Ngf en ratones App<sup>NL-F</sup> envejecidos, y se estudió el desarrollo de posibles alteraciones. Asimismo, se realizaron experimentos *in vitro* de ganancia de función para estudiar la capacidad de la Ngf para rescatar las alteraciones inducidas por A $\beta$ .

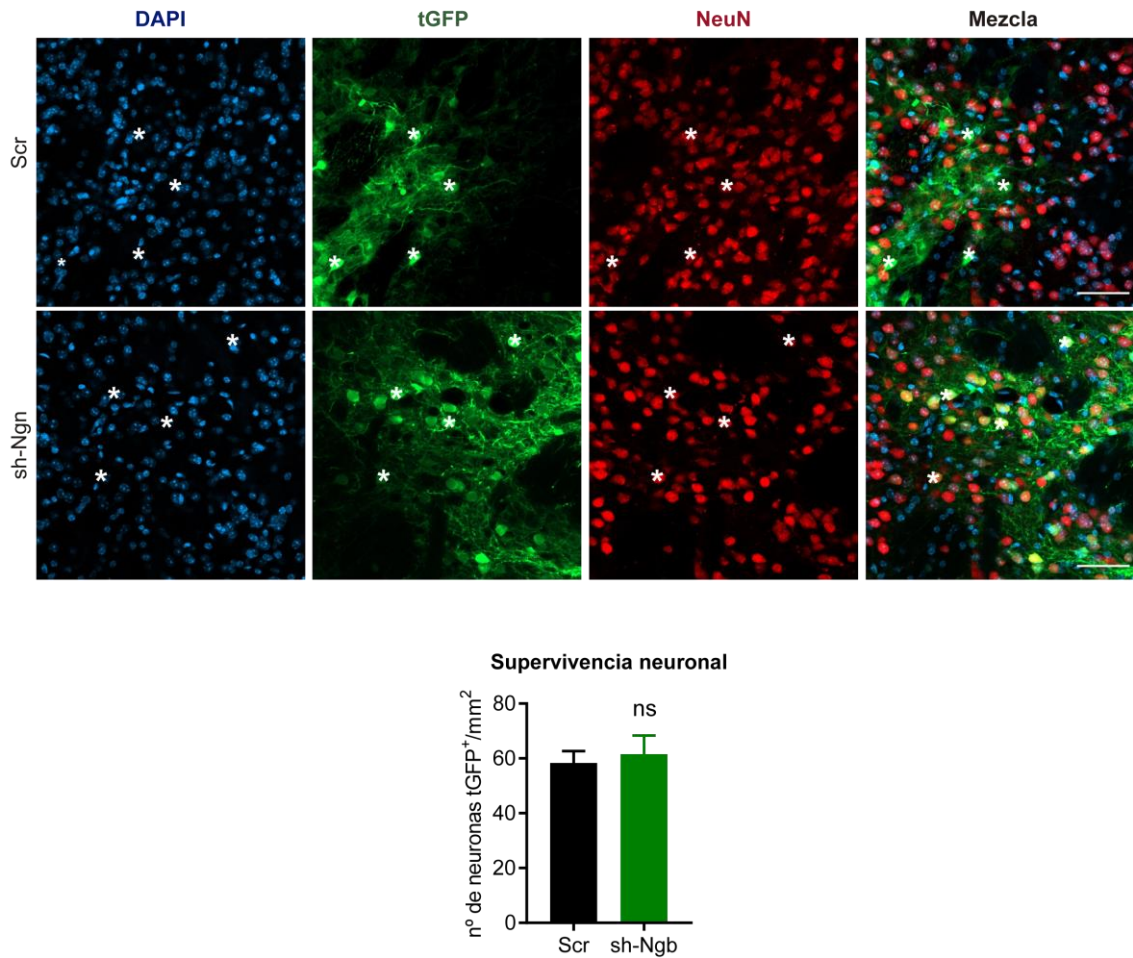
#### 4.1.3. El silenciamiento de Ngf en ratones App<sup>NL-F</sup> produce alteraciones en la arborización dendrítica neuronal

Se silenció la expresión de Ngf en el córtex de ratones App<sup>NL-F</sup> de 18 meses de edad, empleando para ello un lentivirus (sh-Ngf) para la expresión de un *small hairpin* ARN (shRNA) contra el ARN<sub>m</sub> de Ngf, cuya eficiencia de silenciamiento fue superior al 50% en comparación con el virus control o *scramble* (Scr) (Figura 4.17).



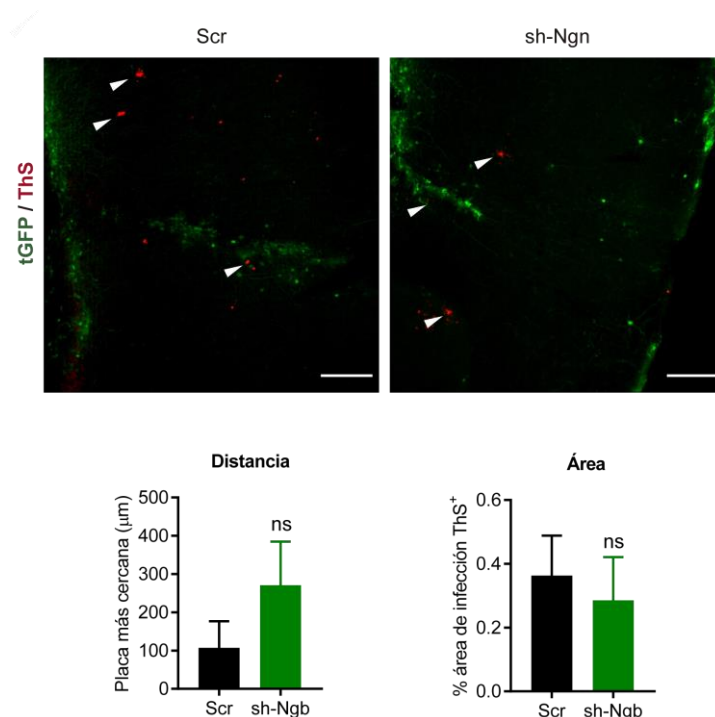
**Figura 4.17 El lentivirus sh-Ngf silencia de manera efectiva la expresión de Ngf en neuronas.** (A) Imágenes de confocal representativas de neuronas en cultivo infectadas con el virus Scr o sh-Ngf (canal tGFP) y la inmunotinción con Ngf (canal Ngf). n=12 neuronas de 3 cultivos independientes (B) Análisis por western blot de la expresión de Ngf en neuronas infectadas con sh-Ngf y Scr. n=3 cultivos independientes. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM, prueba t de Student de dos vías, \*P<0,05 vs Scr. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

En primer lugar, debido al papel antiapoptótico de la Ngf, se analizó la posible pérdida neuronal en la corteza cerebral derivada de su silenciamiento. Como puede apreciarse en la Figura 4.18, el número de neuronas (marcadas con NeuN) positivas para tGFP no disminuyó en los ratones App<sup>NL-F</sup> cuya expresión de Ngf fue silenciada en comparación con los animales inyectados con el virus control.



**Figura 4.18 El silenciamiento de Ngf en ratones App<sup>NL-F</sup> no disminuye la supervivencia neuronal.** Imágenes de confocal representativas del córtex de App<sup>NL-F</sup> de 18 meses infectado con lentivirus Scr o sh-Ngn (arriba) y la cuantificación de células positivas para NeuN y tGFP en el área de infección. Los asteriscos muestran ejemplos de células positivas para NeuN y tGFP. n=15 imágenes de 4 ratones para cada grupo. La gráfica muestra la media  $\pm$ SEM, prueba t de Student de dos vías, ns: no significativo. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

A continuación, debido a la relación entre los niveles de A $\beta$  y la expresión de Ngf que han mostrado estudios anteriores (Khan et al. 2007a; Y. Li et al. 2016), se analizó la deposición de A $\beta$  alrededor del área de infección. Como se observa en la Figura 4.19, el estudio de la deposición de placas amiloides mediante tinción con tioflavina-S (Th-S), no reveló ninguna diferencia entre los ratones infectados con el virus sh-Ngn y el virus control. Por un lado, el porcentaje de área de infección ocupada por placas fue similar en ambos grupos. Asimismo, la distancia desde la zona de infección hasta la primera placa observada, no disminuyó en aquellos ratones App<sup>NL-F</sup> cuya expresión de Ngf se silenció (Figura 4.19).

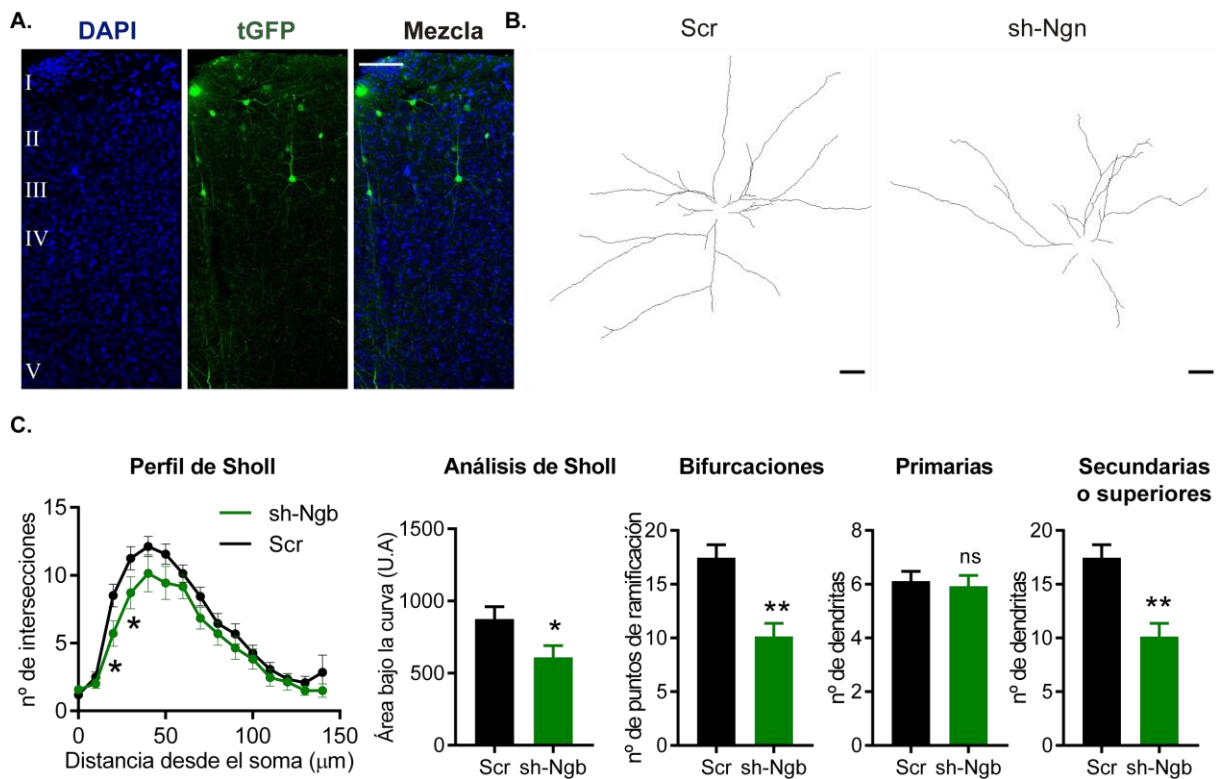


**Figura 4.19 El silenciamiento de Ngn en ratones  $\text{App}^{\text{NL-F}}$  no reduce la deposición de  $\text{A}\beta$ .** Imágenes de confocal representativas del área de infección en la corteza de ratones  $\text{App}^{\text{NL-F}}$  de 18 meses con lentivirus Scr o sh-Ngn (tGFP) y las placas amiloides (Th-S). Las puntas de flecha indican placas amiloides.  $n=10$  imágenes de 4 ratones de cada grupo. Las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, prueba t de Student de dos vías, ns: no significativo. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

En siguiente lugar, se analizó la complejidad del árbol dendrítico en ratones con niveles disminuidos de Ngn. Este tipo de estudio encuentra su justificación en el hecho de que la pérdida de complejidad del árbol dendrítico es una de primeras alteraciones histológicas que ocurren en pacientes con EA y también en modelos animales de esta enfermedad y en condiciones de incubación con péptido amiloide (Grutzendler et al. 2007; Le et al. 2001; Siskova et al. 2014). Para dicho estudio se realizó un análisis morfométrico de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza de animales  $\text{App}^{\text{NL-F}}$  infectados con sh-Ngn o Scr (Figura 4.20 ).

La complejidad del árbol dendrítico, valorado mediante el análisis de Sholl, disminuye en las neuronas de ratones  $\text{App}^{\text{NL-F}}$  infectadas con el virus sh-Ngn (Figura 4.20 ). Además, la ramificación de las dendritas en estas neuronas es significativamente menor, como reveló el estudio del número de bifurcaciones (Figura 4.20 ). Para tratar de dilucidar si esta disminución se debía a una categoría específica de neuronas, se analizó el número de dendritas primarias y el número de dendritas de segundo orden en adelante. Como se observa en la Figura 4.20 C, la disminución del número total de bifurcaciones puede

explicarse por la reducción de la cantidad de dendritas secundarias en adelante, puesto que el número de dendritas primarias es similar en todas las neuronas, independientemente del virus con el que fueron infectadas.

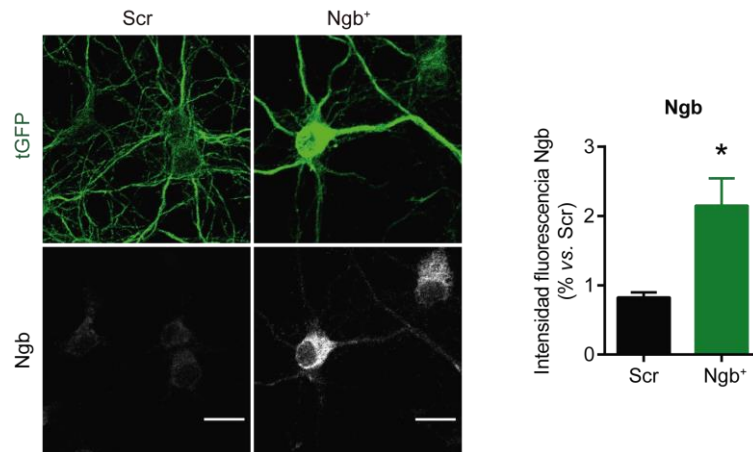


**Figura 4.20 El silenciamiento de Ngb reduce la complejidad dendrítica neuronal en el córtex de ratones *App<sup>NL-F</sup>*.** (A) Imagen de confocal representativa del área de infección y la identificación de las capas corticales en la que se ha basado el estudio. (B) Trazos representativos de la arborización dendrítica de las neuronas corticales de la capa III infectadas con lentivirus Scr o sh-Ngb. (C) Análisis morfométrico de las neuronas infectadas con lentivirus Scr y sh-Ngb. n=17 neuronas de 4 ratones de cada grupo. Las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, prueba t de Student de dos vías, \*P<0,05, \*\*P<0,01, ns: no significativo vs Scr. Barra de escala: 20 µm.

#### 4.1.4. La sobreexpresión de Ngb en neuronas WT en cultivo rescata los efectos tóxicos inducidos por A $\beta$

Debido a que el silenciamiento de Ngb indujo cambios morfológicos en ratones *App<sup>NL-F</sup>*, nos propusimos explorar si la sobreexpresión de Ngb era suficiente para rescatar las alteraciones morfológicas inducidas por A $\beta$ . Para ello, empleamos un lentivirus de sobreexpresión de Ngb (Ng<sup>b+</sup>), que indujo el incremento de los niveles de expresión de Ngb (Figura 4.21).

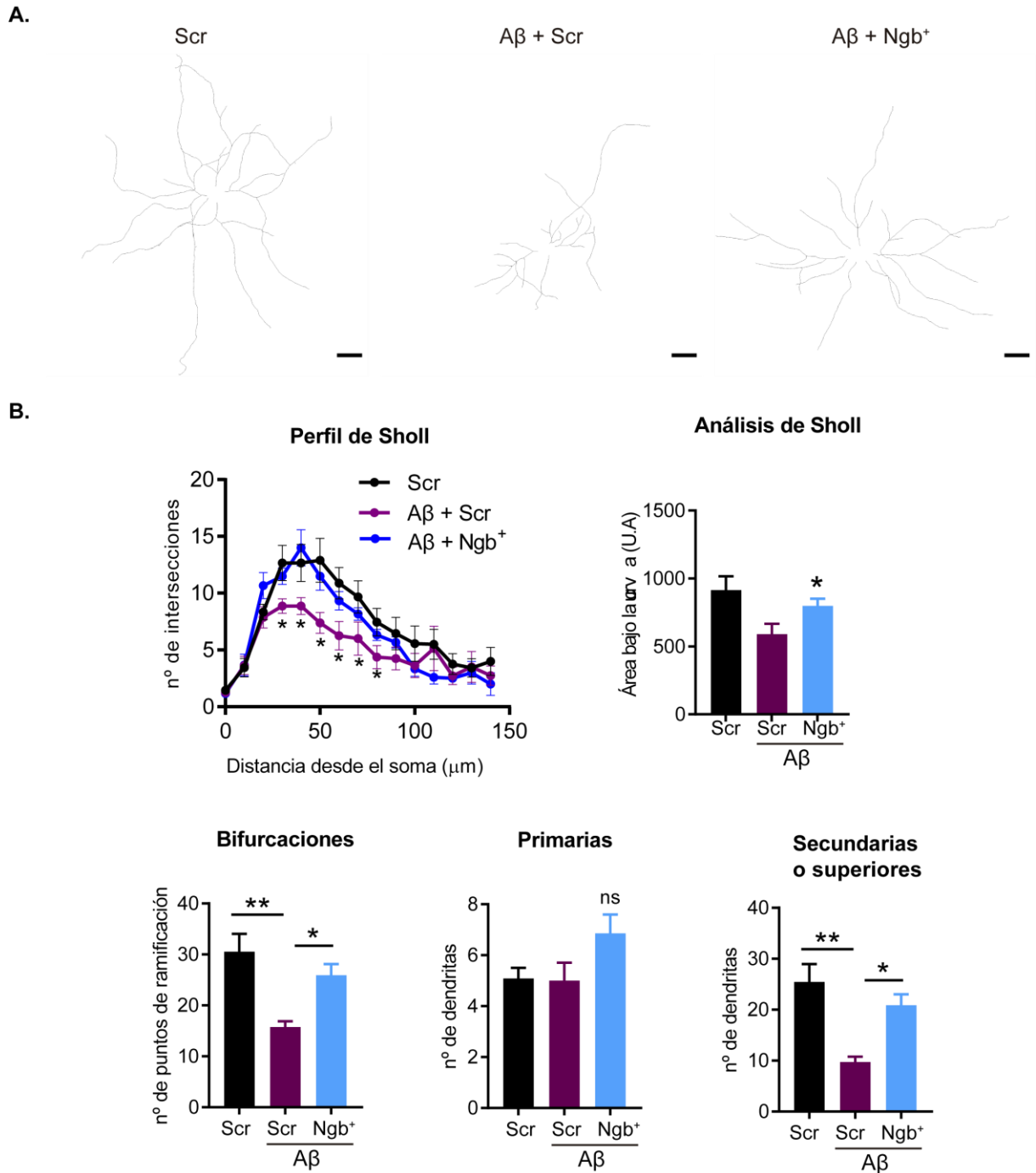




**Figura 4.21 El lentivirus Ngf<sup>+</sup> aumenta la expresión de Ngf en neuronas.** Imágenes representativas de neuronas infectadas con lentivirus Scr o Ngf<sup>+</sup> y la inmunotinción para Ngf (izquierda) y su cuantificación (derecha). n=10 neuronas de 3 cultivos independientes. La gráfica muestra la media  $\pm$ SEM, prueba t de Student de dos vías, \*P<0,05. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

En primer lugar, estudiamos la capacidad del A $\beta$  para inducir alteraciones en la morfología de neuronas corticales de ratones WT en cultivo. Como se observa en la Figura 4.22, el tratamiento con A $\beta$  fibrilar 100 nM fue capaz de reducir la complejidad del árbol dendrítico al cabo de 24 h, analizado mediante el análisis de Scholl. Además, se redujo el número de dendritas de segundo orden en adelante, lo cual supuso una reducción de la cantidad de bifurcaciones totales en las neuronas tratadas con A $\beta$ .

En segundo lugar, nos propusimos valorar la capacidad de la Ngf para restaurar los cambios morfológicos inducidos por A $\beta$ . Las neuronas tratadas con el péptido y que fueron infectadas con el lentivirus Ngf<sup>+</sup> presentan una complejidad dendrítica comparable a las neuronas que no fueron sometidas a tratamiento con A $\beta$  (Figura 4.22). La sobreexpresión de Ngf, además, fue capaz de evitar la pérdida de las dendritas de segundo orden o mayores causada por el tratamiento de A $\beta$ .



**Figura 4.22 La sobreexpresión de Ngb rescata las alteraciones morfológicas inducidas por Aβ en neuronas en cultivo.** (A) Trazos representativos de la arborización dendrítica de neuronas en cultivo infectadas con virus Scr o Ngb<sup>+</sup> y tratadas o no con Aβ. (B) Análisis morfométrico de las neuronas tratadas o no con Aβ e infectadas con el lentivirus correspondiente. n=15 neuronas de 3 cultivos independientes de cada grupo. ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* de Tukey. \* P<0,05, \*\*P<0,01, ns: no significativo.

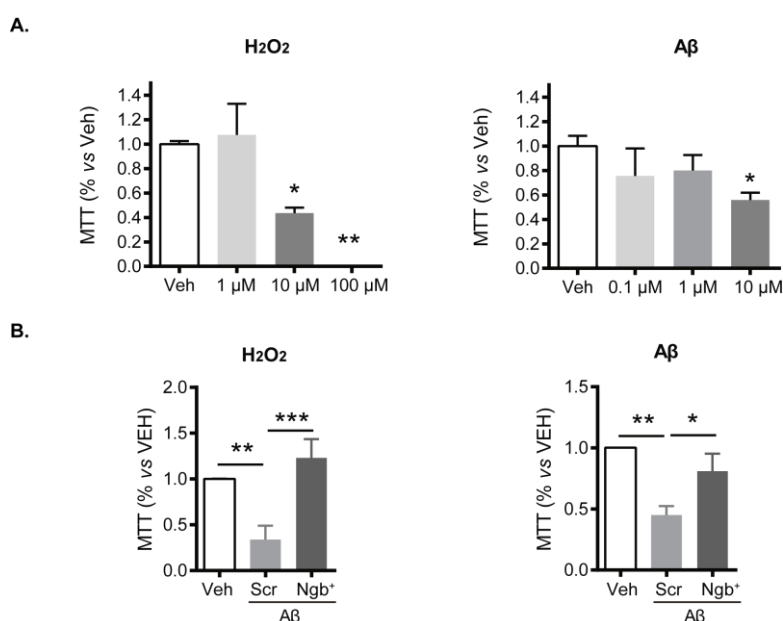


#### 4.1.1. La sobreexpresión de Ngf en neuronas WT en cultivo rescata las alteraciones mitocondriales inducidas por A $\beta$ o por ROS

Por último, debido a la estrecha relación entre la Ngf y la mitocondria, se valoró la capacidad de esta proteína para rescatar la alteración mitocondrial inducida por ROS y por los oligómeros de A $\beta$ .

En primer lugar, se realizó una curva de concentración de dichos tratamientos en neuronas en cultivo, y se eligió aquella para la cual la función mitocondrial, valorada por MTT, estuviera mermada pero sin llegar a resultar demasiado tóxica (Figura 4.23A). Se eligieron las concentraciones correspondientes a una reducción de MTT hasta un 40-50%: ROS 10  $\mu$ M, A $\beta$  oligomérico 10  $\mu$ M.

A continuación, se infectaron neuronas de ratones WT en cultivo con lentivirus Scr o Ngf<sup>+</sup> y se trataron durante 24 h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o A $\beta$  a las concentraciones mencionadas. La sobreexpresión de Ngf fue capaz de rescatar la reducción de MTT producida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M y A $\beta$  oligomérico 10  $\mu$ M (Figura 4.23B).



**Figura 4.23 La sobreexpresión de Ngf rescata la toxicidad mitocondrial inducida por A $\beta$  y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en neuronas en cultivo.** (A) Curva de toxicidad de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y A $\beta$  oligomérico sobre la respiración mitocondrial n=3 cultivos independientes. (B) Rescate de la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M y A $\beta$  10  $\mu$ M en neuronas infectadas con lentivirus Ngf<sup>+</sup>. n=8 cultivos independientes. Las gráficas muestran la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía seguida de análisis *post-hoc* de Tukey, \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*0,001.

## 5. Discusión

### El ratón App<sup>NL-F</sup> como modelo de enfermedad de Alzheimer

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los ratones App<sup>NL-F</sup> son un buen modelo para estudiar la enfermedad de Alzheimer en la etapa preclínica, en la cual hay una prominente amiloidosis cerebral pero aún no existen manifestaciones cognitivas.

De acuerdo con la hipótesis amiloide, generalmente aceptada en el campo de estudio de la EA, la acumulación del péptido A $\beta$  desencadena, mediante múltiples mecanismos de toxicidad (ver sección 1.1.4), eventos neurodegenerativos que conducen, en último término, al declive cognitivo (Selkoe and Hardy 2016). La sobreproducción de A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  en el córtex de estos ratones que se ha descrito en este trabajo es coherente con las mutaciones *Swedish* e *Iberian* y corrobora, mediante una sensible técnica de inmunoensayo (MSD), la acumulación de estas especies descrita por los autores (Saito et al. 2014). Asimismo, la disminución de la proporción A $\beta_{38}$ /A $\beta_{40}$  que se observa concuerda con la mutación *Iberian*, la cual además de favorecer la línea de procesamiento A $\beta_{48}$ -A $\beta_{45}$ -A $\beta_{42}$ -A $\beta_{38}$  por parte del complejo  $\gamma$ -secretasa, disminuye el corte en la cuarta posición, aumentando así los niveles de A $\beta_{42}$  sobre A $\beta_{38}$  (Suarez-Calvet et al. 2014).

Durante la EA, la activación de las células gliales derivada de la acumulación de A $\beta$  conduce a un estado crónico de neuroinflamación que contribuye a la neurodegeneración y empeora el estado cognitivo del paciente (Heneka et al. 2015). Sin embargo, nuestros resultados muestran una leve activación glial en la corteza de los ratones App<sup>NL-F</sup>, a pesar de la acumulación de A $\beta$  descrita. La proliferación o reclutamiento de astrocitos que se observa en estos ratones concuerda y extiende las observaciones realizadas por los autores del modelo y trabajos posteriores (Masuda et al. 2016; Saito et al. 2014). Sin embargo, esta activación astrocitaria no se corresponde con una activación microglial, sino con un estado de alerta o impronta asociado al envejecimiento y que no puede atribuirse a la acumulación de A $\beta$ . Además, el análisis de citoquinas demuestra que esta activación glial moderada no conduce a un estado neuroinflamatorio mayor que el que presentan ratones WT de la misma edad. Si bien estos resultados confrontan aquellos descritos por los autores del modelo, que describen en App<sup>NL-F</sup> de 18 meses un aumento del área de Iba 1 de tres órdenes de magnitud respecto a animales WT (Saito et al. 2014), en un trabajo más reciente los mismos autores

describen que a los 18 meses la activación de microglía, valorada como área de Iba 1, es similar entre ratones App<sup>NL-F</sup> y WT (Masuda et al. 2016), corroborando nuestros datos.

La acumulación neuronal de gránulos de lipofusina forma parte de las alteraciones histopatológicas de los cerebros de los pacientes (Bancher et al. 1989; Braak and Braak 1998; Dowson et al. 1982). La formación de estas estructuras ocurre de manera natural durante el envejecimiento, sin embargo, se acumulan en mayor cantidad en enfermos de Alzheimer debido a un aumento del estrés oxidativo, la pérdida neuronal y la disfunción mitocondrial y del proteasoma que suceden durante la enfermedad (Moreno-Garcia et al. 2018). De hecho, los ROS aumentan el entrecruzamiento de estas macromoléculas y las hacen resistentes a su degradación (Kikugawa et al. 1989). De manera recíproca, la acumulación de lipofusina produce estrés oxidativo y podría repercutir en una mayor acumulación de ROS (Moreno-Garcia et al. 2018). Además, tras la muerte neuronal estos agregados son liberados al medio extracelular, uniéndose a las placas amiloides y contribuyendo a su formación (Bancher et al. 1989; Cataldo et al. 1994; Giaccone et al. 2011; Moreira et al. 2010). Es de notar que la acumulación de macromoléculas oxidadas en forma de gránulos de lipofusina que observamos en el córtex de ratones App<sup>NL-F</sup> se correlaciona con el elevado nivel de estrés oxidativo que demostramos en el presente trabajo. Sin embargo, la falta de alteración del SUP, de la chaperona Hsp 70 o de las vías autofágicas estudiadas (macroautofagia y CMA), son indicativas de que la acumulación de lipofusina y el posible aumento de estrés oxidativo con el que se asocia no son suficientes para repercutir en el mantenimiento de la proteostasis celular de manera que afecte la función. No obstante, merece la pena destacar que se ha observado una tendencia a la acumulación de LC3, implicada en la formación del fagoforo que, si bien no es significativa, podría indicar el inicio de un déficit de la vía macroautofágica, lo que nos podría indicar que, si bien los defectos en proteostasis no llevan disfunción estos podrían desarrollarse a tiempos más tardíos de los estudiados en este trabajo.

Una de las lesiones histopatológicas más características de la EA es la acumulación intracelular de proteína tau hiperfosforilada formando ONF (Braak and Braak 1991). La hiperfosforilación de esta proteína y su desensamblamiento de los microtúbulos incrementa la toxicidad inducida por A $\beta$  y colabora a aumentar la neurodegeneración (ver sección 1.1.5). En este trabajo se demuestra que los ratones App<sup>NL-F</sup> presentan fosforilación de tau en el epítipo patogénico PHF1 (Ser396 y Ser404). La fosforilación de este epítipo solo sucede

durante la EA y se ha relacionado directamente con la desestabilización de los microtúbulos y la formación de filamentos helicoidales apareados (PHF) (Hanger et al. 1998; Noel et al. 2016). En el artículo original donde se caracterizan los cambios que ocurren en los ratones App<sup>NL-F</sup>, los autores describieron una ausencia de fosforilación de tau en los epítomos AT8 y AT180 (Saito et al. 2014). Es posible por lo tanto que las quinasas involucradas en la fosforilación de esos residuos sean diferentes a las que fosforilan PHF1 y que no se encuentren activadas (Noble et al. 2013). La GSK3  $\beta$ , fosforilada en su residuo Tyr 216, es una de las principales quinasas que fosforilan el epítomo PHF 1 de tau (Noel et al. 2016); sin embargo, hemos demostrado que la GSK3  $\beta$  no se encuentra activada en los ratones App<sup>NL-F</sup>, por lo que existe la posibilidad de que otras quinasas sean las responsables de la fosforilación de tau en dicho epítomo en este modelo. Por ejemplo, la MAPK (quinasa activada por mitógenos) (Domise et al. 2016) o la Cdk5 (quinasa dependiente de ciclina 5) (Imahori and Uchida 1997; Piedrahita et al. 2010) son capaces de fosforilar tau en los residuos Ser 396 y Ser 404 (PHF 1). Queda por lo tanto, para estudios posteriores, determinar el grado de actividad de estas quinasas en este modelo. No se ha estudiado la formación de ONF porque, a pesar de encontrarse hiperfosforilada, la proteína tau murina no presenta la misma capacidad de agregación que la proteína humana y no forma estas estructuras (Kampers et al. 1999). Por otro lado, estudios preliminares basados en el análisis de PHFs en el cerebro de ratones APP<sup>NL-F</sup> cruzados con ratones P301S, que expresan la forma humana de tau (Allen et al. 2002), no demostraron un aumento de dichos filamentos (datos no presentados), sugiriendo que el nivel de fosforilación en PHF1 en un fondo con exceso de péptido amiloide como el de los ratones App<sup>NL-F</sup> no es suficiente para inducir formación de PHFs.

Hasta lo que sabemos, en este trabajo se estudia y describe por primera vez la plasticidad sináptica en los ratones App<sup>NL-F</sup>. Las alteraciones sinápticas inducidas por A $\beta$  han sido ampliamente estudiadas y descritas (Palop and Mucke 2010). Así, se sabe que los oligómeros de A $\beta$  juegan un papel importante en la deficiencia de LTP y facilitación de LTD que se observan en múltiples modelos animales de EA de primera generación, entre los que se encuentran APP/PS1 (Gengler et al. 2010), Tg2576 (Jacobsen et al. 2006) y 3xTg (Oddo et al. 2003). En todos estos modelos, las alteraciones sinápticas preceden o acompañan a las alteraciones cognitivas que presentan los ratones. Por lo tanto, no nos sorprendió que la plasticidad sináptica de los ratones App<sup>NL-F</sup> fuera comparable a la de WT, a la vista de la conducta cognitiva de estos ratones.

En este trabajo se ha demostrado, mediante paradigmas comportamentales de gran relevancia en el campo de la neurociencia, que el estado cognitivo de los ratones App<sup>NL-F</sup> a los 21 meses de edad es comparable al de ratones WT. Empleando el laberinto acuático de Morris se demostró que ambos grupos aprendieron a encontrar la plataforma. Normalmente, este aprendizaje debería reflejarse el día del test, en el que los ratones recordarían dónde estaba la plataforma y pasarían más tiempo explorando el Q1. Sin embargo, el día del test ninguno de los grupos parecía recordar dónde se encontraba la plataforma. La posibilidad de que los 4 días de entrenamiento no fueran suficientes para afianzar la memoria en ratones de esta edad parece poco probable, puesto que en la última sesión se observa que alcanzan la plataforma a los 10 segundos de ser introducidos en la piscina. Además, en la mayoría de estudios con ratones la fase de entrenamiento dura 4 días (Bromley-Brits et al. 2011; Weitzner et al. 2015), de manera que alargar el número de sesiones podría complicar las interpretaciones del estudio. Otra posibilidad es que la variable elegida (tiempo en el cuadrante) no sea suficientemente informativa; por ejemplo, en otros estudios se valora el tiempo de nado en la zona de la plataforma, o el tiempo de latencia hasta la zona de la plataforma, dando una información mucho más precisa acerca del comportamiento del ratón (Weitzner et al. 2015). Si bien es cierto que sería recomendable validar la memoria de los ratones WT para afirmar que los App<sup>NL-F</sup> aprenden de la misma manera, la prueba de aprendizaje inverso no solo apunta en la misma dirección, sino que muestra que los ratones App<sup>NL-F</sup> aprenden antes que los WT a encontrar la nueva localización de la plataforma. Por lo tanto, a la vista de los resultados presumimos que una aproximación diferente al estudio comportamental corroboraría nuestras observaciones. De hecho, se ha publicado recientemente un trabajo en el que se confirma la ausencia de alteraciones en el aprendizaje y en la memoria espacial de estos ratones (Masuda et al. 2016), a pesar de que los autores del modelo describieron una sutil pérdida de memoria mediante el laberinto en Y (Saito et al. 2014). Asimismo, la ausencia de declive cognitivo queda nuevamente demostrada en la prueba de condicionamiento al miedo, en la que muestran el mismo comportamiento de inmovilización que ratones WT.

## **Los App<sup>NL-F</sup> están protegidos**

El estudio de los genes relacionados con toxicidad y supervivencia sugiere que los ratones App<sup>NL-F</sup> presentan un perfil similar a la fase preclínica de la enfermedad, en la cual no hay sobreexpresión de genes asociados con muerte neuronal o reducción de genes

protectores, como ocurre en enfermos de Alzheimer en estadios avanzados. Por otro lado, sí hemos observado un aumento en los niveles de ARN<sub>m</sub> del gen NGB en el córtex de ratones App<sup>NL-F</sup> viejos, que se corresponde con un incremento en los niveles de proteína respecto a ratones WT. Fortaleciendo la presunción de que los ratones App<sup>NL-F</sup> viejos se asemejan a la enfermedad preclínica, se ha visto que los niveles de Ngb presentan un aumento de hasta 3 órdenes de magnitud en pacientes en estadios tempranos de la enfermedad (F. Sun et al. 2013), y una disminución en etapas muy avanzadas y en modelos animales con alteraciones cognitivas (L. M. Chen et al. 2012; F. Sun et al. 2013).

Si bien nuestro estudio de expresión génica para explicar la resistencia de los ratones App<sup>NL-F</sup> al exceso de formas tóxicas de péptido amiloide no ha abarcado a todo el genoma (*RNA seq*), nos ha permitido identificar a una proteína, Ngb, que por niveles de expresión y su relación con la EA podría estar contribuyendo a que el fenotipo de los ratones App<sup>NL-F</sup> no sea todo lo severo que uno esperaría en un fondo de exceso de las formas mas tóxicas de péptido amiloide, y durante tanto tiempo (debemos recordar que el incremento en formas tóxicas de péptido es evidente a partir de los 3 meses de edad).

### **El estrés oxidativo inducido por A $\beta$ aumenta la expresión de Neuroglobina en los ratones App<sup>NL-F</sup>**

El aumento de expresión de Ngb en los ratones App<sup>NL-F</sup> viejos nos llevó a postular que dicho incremento podría ser debido a la acumulación de A $\beta$  y, de hecho, cuando neuronas de ratón WT en cultivo son expuestas a A $\beta$ <sub>42</sub> sintético, la expresión de Ngb aumenta. Dada la capacidad del A $\beta$  de generar estrés oxidativo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Harris et al. 2007; Sultana et al. 2006)(ver sección 1.1.4), nuestra predicción fue que el aumento de Ngb inducido por A $\beta$  es debido a la acumulación de estrés oxidativo. De manera consistente, el aumento de Ngb por A $\beta$  no se produce cuando las neuronas en cultivo son pre-tratadas con NAC, uno de los antioxidantes más eficaces (Zafarullah et al. 2003). Además de la inducción por A $\beta$ , el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se considera un mecanismo eficaz para inducir producción de ROS y RNS (Li et al 2007, Brain Res), también fue suficiente para incrementar los niveles de Ngb *in vitro*. Estos resultados van en la misma línea de trabajos anteriores donde se demostró que Ngb se expresa en respuesta a estrés oxidativo, en células de cáncer de mama (Fiocchetti et al. 2016) y en la línea celular PC12 (R. C. Li et al. 2008b). Por ende, los niveles elevados de Ngb que reportamos en la corteza de los ratones App<sup>NL-F</sup> son consistentes con el concepto de que esta proteína es un componente de la vía de respuesta a

estrés. Dado que los niveles elevados de Ngf se observaron en los ratones App<sup>NL-F</sup> viejos pero no en ratones WT de la misma edad, podemos concluir que el aumento de esta proteína es dependiente de los niveles de estrés oxidativo supra fisiológicos relacionados con el genotipo App<sup>NL-F</sup>.

El mecanismo molecular mediante el cual el estrés oxidativo inducido por A $\beta$  estaría aumentando los niveles de Ngf merece ser analizado y estudiado en profundidad. El promotor de la Ngf presenta un sitio  $\kappa$ B de 10 pb al cual se pueden unir algunos miembros de la familia de proteínas NF- $\kappa$ B, que son factores de transcripción involucrados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Jones and Kounatidis 2017; Q. Zhang et al. 2017). Específicamente, la región promotora de Ngf puede ser reconocida por RelA (o p65) y cRel, con un dominio TAD en C-terminal que permite la regulación transcripcional, y por p50, que es el producto derivado del procesamiento de p105 por el proteasoma (Morgan and Liu 2011; Tilstra et al. 2011). Si bien todos los miembros de la familia NF- $\kappa$ B pueden dimerizar entre ellos, originando distintas combinaciones de dímeros que regulan diferentes grupos de genes, p50 normalmente se encuentra asociado a RelA (o cRel) en forma de heterodímero y formando parte de la señalización canónica de NF- $\kappa$ B (Morgan and Liu 2011). En esta vía molecular, el heterodímero está inactivo de manera constitutiva por la interacción con las proteínas I $\kappa$ B, que enmascaran sus sitios de unión al ADN y lo mantienen en el citoplasma mediante potentes señales de exportación nuclear (NES). La activación de la vía canónica fosforila I $\kappa$ B en los residuos Ser 32 y Ser 36, marcándola para su degradación por el proteasoma y permitiendo así la traslocación del heterodímero p50/RelA al núcleo y su regulación transcripcional. Entre la gran cantidad de estímulos relacionados con la EA que pueden activar esta vía, se encuentran la activación de receptores proinflamatorios (TLR, receptores de TNF y de IL 1 $\beta$ ) (Osborn et al. 1989) y el estrés oxidativo (Cooke and Davidge 2002; Schreck et al. 1991). Además, se ha demostrado que el péptido A $\beta$  puede activar directamente NF- $\kappa$ B (Behl et al. 1994; Kawamoto et al. 2008). La acumulación de A $\beta$  y el estrés oxidativo que se ha demostrado a lo largo de este trabajo en los ratones App<sup>NL-F</sup> podría estar desencadenando la activación de NF- $\kappa$ B y activando la transcripción de Ngf. A este respecto, un estudio reciente ha demostrado que el fragmento neurotóxico A $\beta$ <sub>25-35</sub> incrementa los niveles de Ngf en el neuroblastoma N2a mediante la unión de NF $\kappa$ B al promotor (N. Liu et al. 2018). Además, el leve aumento de los niveles de TNF $\alpha$  que se observa en estos ratones podría ser suficiente para activar receptores de TNF y contribuir así a la activación de NF- $\kappa$ B. Para testar esta posibilidad se debería analizar la localización subcelular de NF- $\kappa$ B en ratones

App<sup>NL-F</sup>, así como analizar el efecto de la inactivación de NF- $\kappa$ B (mediante knock-down o inhibidores específicos) sobre la expresión de Ngb.

En conjunto, proponemos que el estrés oxidativo y la acumulación de A $\beta$  podrían activar la regulación transcripcional de Ngb a través de NF- $\kappa$ B, y producir así una sobreexpresión de la proteína que permitiría activar los mecanismos de protección descritos en este trabajo. Esta es una línea de investigación para futuros trabajos.

## **La Neuroglobina como responsable de la prevención de la toxicidad inducida por A $\beta$**

Los resultados *in vivo* basados en la reducción de los niveles de expresión de Ngb, donde observamos una pérdida de la complejidad del árbol dendrítico, sugieren que la función neuroprotectora de esta proteína sería fundamental para mantener la integridad estructural de las neuronas. Así, además (o como consecuencia) de su función antiapoptótica y reguladora del estrés oxidativo, el aumento de expresión de Ngb en los ratones App<sup>NL-F</sup> podría explicar la ausencia de fenotipo comportamental y la resistencia de este modelo de ratón a la acumulación de A $\beta$ . De hecho, la pérdida de la complejidad dendrítica es uno de los eventos más tempranos en la EA y se ha observado en tejido *post-mortem* de pacientes y en modelos animales (Grutzendler et al. 2007; Le et al. 2001; Siskova et al. 2014; Tsai et al. 2004). Por otro lado, la excitabilidad neuronal está directamente relacionada con la morfología de su árbol dendrítico (Rall 1962; Rall and Rinzel 1973) y, de acuerdo con ello, recientemente se ha demostrado que la simplificación dendrítica que produce el A $\beta$  aumenta la excitabilidad neuronal y desemboca en una desensibilización de las neuronas para responder a la estimulación eléctrica (Siskova et al. 2014). Como se ha demostrado en esta tesis doctoral, la pérdida de la complejidad morfológica tras el silenciamiento de Ngb, pone en evidencia la necesidad de esta proteína en el mantenimiento del árbol dendrítico en presencia de A $\beta$ . De manera complementaria, ha sido demostrada la suficiencia de Ngb para recuperar las alteraciones morfológicas inducidas por A $\beta$  en neuronas *in vitro*. Por lo tanto, proponemos que el mantenimiento estructural que ejerce la Ngb, probablemente a través de reducir los efectos nocivos del estrés oxidativo, es responsable, al menos en parte, de la ausencia de alteraciones electrofisiológicas y comportamentales en los ratones App<sup>NL-F</sup>. No obstante, sería interesante profundizar en esta hipótesis y estudiar las consecuencias funcionales del silenciamiento de Ngb, mediante registros electrofisiológicos unicelulares (*patch clamp*) en neuronas infectadas con sh-Ngb. Asimismo, este estudio podría completarse



mediante el análisis de la morfología dendrítica de animales WT, que presumimos tendría una complejidad comparable a la observada en ratones App<sup>NL-F</sup>, como sugieren los resultados sobre plasticidad sináptica.

¿La protección de la integridad estructural mediada por Ngf es una simple consecuencia indirecta de su papel antiapoptótico o es a través también de un rol directo? Como hemos descrito anteriormente (sección 1.1.11), la Ngf es una hemoproteína que protege a las neuronas contra el estrés celular y muerte inducida en condiciones de isquemia (X. Wang et al. 2008). En este sentido, es posible que el aumento de Ngf prevenga contra los efectos nocivos de A $\beta$  a nivel del árbol dendrítico simplemente porque previene el daño que los radicales libres producen en la maquinaria molecular responsable de la integridad dendrítica, sea a nivel de proteínas de membrana o del citoesqueleto, por mencionar algunos de los componentes más conspicuos. Por otro lado, no podemos descartar un rol directo, a través de un efecto directo de Ngf sobre tau, impidiendo que formas anormales de fosforilación de tau penetren en las dendritas. Mientras que tau es una proteína axonal, en la EA su forma hiperfosforilada se acumula en el soma y en las dendritas alterando su morfología. Los oligómeros de A $\beta$  inducen la localización de tau en las dendritas mediante su fosforilación (A. Ittner and Ittner 2018). De esta forma, las alteraciones en el árbol dendrítico observados en los ratones App<sup>NL-F</sup> infectados con el sh-Ngf podrían deberse a la presencia de altos niveles de PHF-tau (incluso más altos que los observados en condiciones basales) u otros fosfo epítomos, los niveles de los cuales estuvieran limitados o prevenidos por Ngf. De hecho, se ha descrito que la Ngf previene la fosforilación de tau en los epítomos Ser396, Ser404, Thr231 y Ser/195/198/199/202 (L. M. Chen et al. 2012). Este posible mecanismo merece nuevos estudios para su validación.

En cuanto al papel antiapoptótico de la Ngf en este modelo, es sorprendente que no se haya observado muerte neuronal en los ratones App<sup>NL-F</sup> infectados con sh-Ngf, puesto que esta proteína está estrechamente involucrada en vías celulares antiapoptóticas (ver sección 1.1.10C). Sin embargo, es posible que la muerte de las neuronas infectadas no sea tan profusa como para ser detectada mediante el conteo de neuronas en el área de infección. En este sentido, un marcaje específico de la vía apoptótica (caspasa 3 o fractina) podría detectar un porcentaje de muerte pequeño entre un gran número de neuronas. No obstante, es importante tener en cuenta que el proceso de apoptosis es un evento que únicamente puede ser detectado durante una ventana de tiempo muy concreta y, más importante, que la muerte

neuronal que se observa en la EA está mayoritariamente mediada por necrosis o incluso ambos eventos pueden superponerse en el tiempo (Behl 2000). Por último, es posible que el grado de silenciamiento de Ngb o la cantidad de A $\beta$  en el cerebro de ratones App<sup>NL-F</sup> no sea suficiente para inducir muerte neuronal, ya que se podrían estar activando otras vías moleculares para asegurar la supervivencia neuronal (ver sección 0). De hecho, a excepción de algunos modelos (Han et al. 2017; Takuma et al. 2004), la gran mayoría de animales para esta enfermedad no presentan muerte neuronal, independientemente de la intensidad del fenotipo. Por este motivo se realizaron los experimento *in vitro*, donde se demostró la capacidad de la Ngb para rescatar la pérdida de función mitocondrial inducida por una concentración tóxica de A $\beta$ , complementando y extendiendo los resultados de estudios previos donde se ha sugerido una inhibición de la apoptosis mediada por A $\beta$  en líneas celulares (R. C. Li et al. 2008a; Y. Li et al. 2016).

Por otro lado, en este trabajo no se ha observado aumento de la deposición de A $\beta$  en las áreas corticales donde se silenció Ngb. En un estudio anterior (Khan et al. 2007a), se observó que los ratones transgénicos APP<sub>Sw,Ind</sub> presentan menos cantidad de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>, además de una ausencia total de placas, al ser cruzados con ratones que sobreexpresan Ngb. Los autores especulan que el procesamiento de APP podría estar siendo afectado por la Ngb. En un trabajo más reciente (Y. Li et al. 2016), la inyección de un plásmido de sobreexpresión de Ngb en ratones APP/PS1 también reduce la acumulación y deposición del péptido, presumiblemente mediante la reducción de la activación de caspasas, que también están involucradas en el procesamiento de APP (Nhan et al. 2015). Sin embargo, estas teorías no han sido demostradas, por lo que el mecanismo mediante el cual la Ngb redujo los niveles de A $\beta$  no está esclarecido. Por otra parte, como ocurre con el estudio de la muerte neuronal *in vivo*, existe la posibilidad de que el silenciamiento no sea lo suficientemente potente como para observar diferencias en la deposición de placas a nivel local. Por todo ello, sería más adecuado generar una línea de ratones App<sup>NL-F</sup>/Ngb<sup>-/-</sup> en los que poder estudiar la acumulación de A $\beta$  mediante inmunoensayo así como investigar los distintos mecanismos de muerte neuronal. Además, nos permitiría conocer las implicaciones funcionales del silenciamiento de Ngb a nivel comportamental, y poder demostrar las implicaciones funcionales del mantenimiento de la morfología neuronal inducido por Ngb.

Por lo tanto, en resumen, proponemos que el aumento de la Ngb, inducido por el estrés oxidativo derivado de la acumulación de A $\beta$  en ratones NL-F, previene la alteración

estructural, y previsiblemente funcional, inducida por A $\beta$ . Esto podría explicar, al menos en parte, la ausencia de declive cognitivo en este modelo y en pacientes cognitivamente sanos con carga amiloide cerebral.

## 6. Conclusiones

1. Los ratones App<sup>NL-F</sup> se caracterizan por presentar acumulación de péptido A $\beta$  con la edad y sutiles signos bioquímicos e histológicos de tipo Alzheimer
2. Los signos patológicos no se corresponden con la presencia de defectos funcionales.
3. Los ratones App<sup>NL-F</sup> presentan un incremento de los niveles de la hemoproteína citoprotectora Ngb durante el envejecimiento.
4. La acumulación de A $\beta$  induce un aumento de la expresión de Ngb mediante mecanismos dependientes de estrés oxidativo.
5. El silenciamiento de Ngb *in vivo* reduce la complejidad dendrítica de las neuronas corticales de ratones App<sup>NL-F</sup>.
6. La sobreexpresión de Ngb *in vitro* rescata las alteraciones morfológicas inducidas por A $\beta$ .

## Bibliografía

- Abramov, E., et al. (2009), 'Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses', *Nat Neurosci*, 12 (12), 1567-76.
- Allen, B., et al. (2002), 'Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein', *J Neurosci*, 22 (21), 9340-51.
- Aluise, C. D., et al. (2011), 'Redox proteomics analysis of brains from subjects with amnesic mild cognitive impairment compared to brains from subjects with preclinical Alzheimer's disease: insights into memory loss in MCI', *J Alzheimers Dis*, 23 (2), 257-69.
- American Psychiatric Association (2013), *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th edn.; Washington, DC).
- Andrew, R. J., et al. (2016), 'A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis', *J Biol Chem*, 291 (37), 19235-44.
- Ballatore, C., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2007), 'Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders', *Nat Rev Neurosci*, 8 (9), 663-72.
- Bancher, C., et al. (1989), 'Immunoreactivity of neuronal lipofuscin with monoclonal antibodies to the amyloid beta-protein', *Neurobiol Aging*, 10 (2), 125-32.
- Barone, E., et al. (2011), 'Biliverdin reductase--a protein levels and activity in the brains of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment', *Biochim Biophys Acta*, 1812 (4), 480-7.
- Behl, C. (2000), 'Apoptosis and Alzheimer's disease', *J Neural Transm (Vienna)*, 107 (11), 1325-44.
- Behl, C., et al. (1994), 'Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity', *Cell*, 77 (6), 817-27.
- Bloom, G. S. (2014), 'Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis', *JAMA Neurol*, 71 (4), 505-8.
- Braak, H. and Braak, E. (1991), 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathol*, 82 (4), 239-59.
- (1998), 'Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease', *J Neural Transm Suppl*, 53, 127-40.
- Bromley-Brits, K., Deng, Y., and Song, W. (2011), 'Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice', *J Vis Exp*, (53).
- Bryson, H. M. and Benfield, P. (1997), 'Donepezil', *Drugs Aging*, 10 (3), 234-9; discussion 40-1.
- Burmester, T., Gerlach, F., and Hankeln, T. (2007), 'Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia', *Adv Exp Med Biol*, 618, 169-80.
- Burmester, T., et al. (2000), 'A vertebrate globin expressed in the brain', *Nature*, 407 (6803), 520-3.
- Cagnin, A., et al. (2001), 'In-vivo measurement of activated microglia in dementia', *Lancet*, 358 (9280), 461-7.
- Caille, I., et al. (2004), 'Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone', *Development*, 131 (9), 2173-81.
- Casado, B., et al. (2005), 'Human neuroglobin protein in cerebrospinal fluid', *Proteome Sci*, 3 (1), 2.
- Cataldo, A. M., Hamilton, D. J., and Nixon, R. A. (1994), 'Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease', *Brain Res*, 640 (1-2), 68-80.
- Cheignon, C., et al. (2018), 'Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease', *Redox Biol*, 14, 450-64.

- Chen, G. F., et al. (2017), 'Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development', *Acta Pharmacol Sin*, 38 (9), 1205-35.
- Chen, L. M., et al. (2012), 'Neuroglobin attenuates Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating Akt signaling', *J Neurochem*, 120 (1), 157-64.
- Chen, X. Q., et al. (2005), 'Presence of neuroglobin in cultured astrocytes', *Glia*, 50 (2), 182-6.
- Cooke, C. L. and Davidge, S. T. (2002), 'Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells', *Am J Physiol Cell Physiol*, 282 (2), C395-402.
- Corder, E. H., et al. (1993), 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families', *Science*, 261 (5123), 921-3.
- Coulson, E. J., et al. (2000), 'What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function', *Neurochem Int*, 36 (3), 175-84.
- Dawson, G. R., et al. (1999), 'Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein', *Neuroscience*, 90 (1), 1-13.
- De Marinis, E., et al. (2013), 'Neuroglobin upregulation induced by 17beta-estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of neuroblastoma cells', *Cell Death Dis*, 4, e508.
- DeKosky, S. T. and Scheff, S. W. (1990), 'Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity', *Ann Neurol*, 27 (5), 457-64.
- DellaValle, B., et al. (2010), 'In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis', *Glia*, 58 (10), 1220-7.
- Dewilde, S., et al. (2001), 'Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family', *J Biol Chem*, 276 (42), 38949-55.
- Dinamarca, M. C., Rios, J. A., and Inestrosa, N. C. (2012), 'Postsynaptic Receptors for Amyloid-beta Oligomers as Mediators of Neuronal Damage in Alzheimer's Disease', *Front Physiol*, 3, 464.
- Dineley, K. T., et al. (2002), 'beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes', *J Biol Chem*, 277 (28), 25056-61.
- Domise, M., et al. (2016), 'AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo', *Sci Rep*, 6, 26758.
- Dong, Y., et al. (2010), '14-3-3gamma and neuroglobin are new intrinsic protective factors for cerebral ischemia', *Mol Neurobiol*, 41 (2-3), 218-31.
- Dowson, J. H., et al. (1982), 'Autofluorescence emission spectra of neuronal lipopigment in animal and human ceroidoses (ceroid-lipofuscinoses)', *Acta Neuropathol*, 58 (2), 152-6.
- Driver, J. A. and Lu, K. P. (2010), 'Pin1: a new genetic link between Alzheimer's disease, cancer and aging', *Curr Aging Sci*, 3 (3), 158-65.
- Duff, K., et al. (1996), 'Increased amyloid-beta<sub>42</sub>(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1', *Nature*, 383 (6602), 710-3.
- Eckman, C. B., et al. (1997), 'A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta<sub>42</sub>(43)', *Hum Mol Genet*, 6 (12), 2087-9.
- Fago, A., et al. (2004), 'Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins', *IUBMB Life*, 56 (11-12), 689-96.
- Fiocchetti, M., et al. (2014), 'Neuroglobin, a pro-survival player in estrogen receptor alpha-positive cancer cells', *Cell Death Dis*, 5, e1449.
- Fiocchetti, M., et al. (2016), 'Neuroglobin in Breast Cancer Cells: Effect of Hypoxia and Oxidative Stress on Protein Level, Localization, and Anti-Apoptotic Function', *PLoS One*, 11 (5), e0154959.

- Fordel, E., et al. (2006), 'Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death', *Neurosci Lett*, 410 (2), 146-51.
- Furukawa, K., et al. (1996), 'Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain', *J Neurochem*, 67 (5), 1882-96.
- Gengler, S., Hamilton, A., and Holscher, C. (2010), 'Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice', *PLoS One*, 5 (3), e9764.
- Geuens, E., et al. (2003), 'A globin in the nucleus!', *J Biol Chem*, 278 (33), 30417-20.
- Giaccone, G., et al. (2011), 'Lipofuscin hypothesis of Alzheimer's disease', *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 1 (1), 292-6.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984), 'Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein', *Biochem Biophys Res Commun*, 120 (3), 885-90.
- Goate, A., et al. (1991), 'Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease', *Nature*, 349 (6311), 704-6.
- Grabert, K., et al. (2016), 'Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging', *Nat Neurosci*, 19 (3), 504-16.
- Grabowski, T. J., et al. (2001), 'Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy', *Ann Neurol*, 49 (6), 697-705.
- Grutzendler, J., et al. (2007), 'Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease', *Ann N Y Acad Sci*, 1097, 30-9.
- Guerreiro, R. J., Gustafson, D. R., and Hardy, J. (2012), 'The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE', *Neurobiol Aging*, 33 (3), 437-56.
- Guerreiro, R. J., et al. (2010), 'Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP', *Neurobiol Aging*, 31 (5), 725-31.
- Guglielmotto, M., et al. (2016), 'E2 Regulates Epigenetic Signature on Neuroglobin Enhancer-Promoter in Neuronal Cells', *Front Cell Neurosci*, 10, 147.
- Guilloureau, L., et al. (2007), 'Redox chemistry of copper-amyloid-beta: the generation of hydroxyl radical in the presence of ascorbate is linked to redox-potentials and aggregation state', *Chembiochem*, 8 (11), 1317-25.
- Guimaraes, B. G., et al. (2014), 'The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70 (Pt 4), 1005-14.
- Guivernau, B., et al. (2016), 'Amyloid-beta Peptide Nitrotyrosination Stabilizes Oligomers and Enhances NMDAR-Mediated Toxicity', *J Neurosci*, 36 (46), 11693-703.
- Gwon, A. R., et al. (2012), 'Oxidative lipid modification of nicastrin enhances amyloidogenic gamma-secretase activity in Alzheimer's disease', *Aging Cell*, 11 (4), 559-68.
- Haines, B., et al. (2012), 'Hypoxia-inducible factor-1 and neuroglobin expression', *Neurosci Lett*, 514 (2), 137-40.
- Halle, A., et al. (2008), 'The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta', *Nat Immunol*, 9 (8), 857-65.
- Han, X. J., et al. (2017), 'Amyloid beta-42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria', *Mol Med Rep*, 16 (4), 4521-28.
- Hanger, D. P., et al. (1998), 'New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry', *J Neurochem*, 71 (6), 2465-76.

- Hankeln, T., et al. (2004), 'The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function?', *IUBMB Life*, 56 (11-12), 671-9.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002), 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297 (5580), 353-6.
- Harris, S. E., et al. (2007), 'A genetic association analysis of cognitive ability and cognitive ageing using 325 markers for 109 genes associated with oxidative stress or cognition', *BMC Genet*, 8, 43.
- Heneka, M. T., et al. (2015), 'Neuroinflammation in Alzheimer's disease', *Lancet Neurol*, 14 (4), 388-405.
- Herold, S., et al. (2004), 'Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress', *J Biol Chem*, 279 (22), 22841-7.
- Hoey, S. E., Williams, R. J., and Perikinton, M. S. (2009), 'Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production', *J Neurosci*, 29 (14), 4442-60.
- Hong, M., et al. (1998), 'Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17', *Science*, 282 (5395), 1914-7.
- Hsiao, K., et al. (1996), 'Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice', *Science*, 274 (5284), 99-102.
- Hsieh, H., et al. (2006), 'AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss', *Neuron*, 52 (5), 831-43.
- Hundahl, C. A., et al. (2010), 'Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain', *Brain Res*, 1331, 58-73.
- Imahori, K. and Uchida, T. (1997), 'Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease', *J Biochem*, 121 (2), 179-88.
- Ittner, A. and Ittner, L. M. (2018), 'Dendritic Tau in Alzheimer's Disease', *Neuron*, 99 (1), 13-27.
- Ittner, L. M., et al. (2010), 'Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models', *Cell*, 142 (3), 387-97.
- Jacobsen, J. S., et al. (2006), 'Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (13), 5161-6.
- Jang, H., et al. (2009), 'Misfolded amyloid ion channels present mobile beta-sheet subunits in contrast to conventional ion channels', *Biophys J*, 97 (11), 3029-37.
- Jones, S. V. and Kounatidis, I. (2017), 'Nuclear Factor-Kappa B and Alzheimer Disease, Unifying Genetic and Environmental Risk Factors from Cell to Humans', *Front Immunol*, 8, 1805.
- Kahle, P. J. and De Strooper, B. (2003), 'Attack on amyloid', *EMBO Rep*, 4 (8), 747-51.
- Kampers, T., et al. (1999), 'Assembly of paired helical filaments from mouse tau: implications for the neurofibrillary pathology in transgenic mouse models for Alzheimer's disease', *FEBS Lett*, 451 (1), 39-44.
- Kandel, N., et al. (2017), 'Membrane Binding and Pore Formation by a Cytotoxic Fragment of Amyloid beta Peptide', *J Phys Chem B*, 121 (45), 10293-305.
- Karch, C. M., Cruchaga, C., and Goate, A. M. (2014), 'Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic', *Neuron*, 83 (1), 11-26.
- Kawamoto, E. M., et al. (2008), 'Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells', *J Neurosci Res*, 86 (4), 845-60.
- Khan, A. A., et al. (2007a), 'Neuroglobin attenuates beta-amyloid neurotoxicity in vitro and transgenic Alzheimer phenotype in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (48), 19114-9.



- Khan, A. A., et al. (2007b), 'A neuroglobin-overexpressing transgenic mouse', *Gene*, 398 (1-2), 172-6.
- Kikugawa, K., et al. (1989), 'Fluorescent and cross-linked proteins formed by free radical and aldehyde species generated during lipid oxidation', *Adv Exp Med Biol*, 266, 345-56; discussion 57.
- Kimberly, W. T., et al. (2003), 'Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (11), 6382-7.
- Klein, W. L., Krafft, G. A., and Finch, C. E. (2001), 'Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?', *Trends Neurosci*, 24 (4), 219-24.
- Kole, A. J., Annis, R. P., and Deshmukh, M. (2013), 'Mature neurons: equipped for survival', *Cell Death Dis*, 4, e689.
- Kretner, B., et al. (2016), 'Generation and deposition of Abeta43 by the virtually inactive presenilin-1 L435F mutant contradicts the presenilin loss-of-function hypothesis of Alzheimer's disease', *EMBO Mol Med*, 8 (5), 458-65.
- Kullmann, D. M. and Lamsa, K. P. (2007), 'Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons', *Nat Rev Neurosci*, 8 (9), 687-99.
- Kummer, M. P., et al. (2011), 'Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation', *Neuron*, 71 (5), 833-44.
- Latz, E., Xiao, T. S., and Stutz, A. (2013), 'Activation and regulation of the inflammasomes', *Nat Rev Immunol*, 13 (6), 397-411.
- Laurent, C., Buee, L., and Blum, D. (2018), 'Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies?', *Biomed J*, 41 (1), 21-33.
- Le, R., et al. (2001), 'Plaque-induced abnormalities in neurite geometry in transgenic models of Alzheimer disease: implications for neural system disruption', *J Neuropathol Exp Neurol*, 60 (8), 753-8.
- Li, H., et al. (2014), 'Vascular and parenchymal amyloid pathology in an Alzheimer disease knock-in mouse model: interplay with cerebral blood flow', *Mol Neurodegener*, 9, 28.
- Li, R. C., et al. (2008a), 'Neuroglobin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury', *Neurobiol Aging*, 29 (12), 1815-22.
- Li, R. C., et al. (2008b), 'Neuroglobin protects PC12 cells against oxidative stress', *Brain Res*, 1190, 159-66.
- Li, S., et al. (2009), 'Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake', *Neuron*, 62 (6), 788-801.
- Li, W., et al. (2011), 'The activity of recombinant human neuroglobin as an antioxidant and free radical scavenger', *Proteins*, 79 (1), 115-25.
- Li, Y., et al. (2016), 'Neuroglobin Attenuates Beta Amyloid-Induced Apoptosis Through Inhibiting Caspases Activity by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway', *J Mol Neurosci*, 58 (1), 28-38.
- Liu, N., et al. (2013), 'Transcriptional regulation of mouse neuroglobin gene by cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) in N2a cells', *Neurosci Lett*, 534, 333-7.
- Liu, N., et al. (2012a), 'Transcriptional regulation mechanisms of hypoxia-induced neuroglobin gene expression', *Biochem J*, 443 (1), 153-64.
- Liu, N., et al. (2018), 'Amyloid-beta25-35 Upregulates Endogenous Neuroprotectant Neuroglobin via NFkappaB Activation in vitro', *J Alzheimers Dis*, 64 (4), 1163-74.
- Liu, Q., et al. (2005), 'Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations', *Free Radic Biol Med*, 38 (6), 746-54.
- Liu, S., et al. (2012b), 'TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation', *J Immunol*, 188 (3), 1098-107.

- Lu, P., et al. (2014a), 'Three-dimensional structure of human gamma-secretase', *Nature*, 512 (7513), 166-70.
- Lu, R. C., et al. (2014b), 'Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease', *Biomed Res Int*, 2014, 435203.
- MacManus, A., et al. (2000), 'Enhancement of (45)Ca(2+) influx and voltage-dependent Ca(2+) channel activity by beta-amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta', *J Biol Chem*, 275 (7), 4713-8.
- Masters, C. L., et al. (2015), 'Alzheimer's disease', *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15056.
- Masuda, A., et al. (2016), 'Cognitive deficits in single App knock-in mouse models', *Neurobiol Learn Mem*, 135, 73-82.
- Mirza, Z., et al. (2014), 'Proteomics approaches to understand linkage between Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 13 (2), 213-25.
- Mitz, S. A., et al. (2009), 'When the brain goes diving: glial oxidative metabolism may confer hypoxia tolerance to the seal brain', *Neuroscience*, 163 (2), 552-60.
- Morawski, M., et al. (2014), 'Glutaminy cyclase in human cortex: correlation with (pGlu)-amyloid-beta load and cognitive decline in Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 39 (2), 385-400.
- Moreira, P. I., et al. (2010), 'Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology', *Biochim Biophys Acta*, 1802 (1), 2-10.
- Moreno-Garcia, A., et al. (2018), 'An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration', *Front Neurosci*, 12, 464.
- Morgan, M. J. and Liu, Z. G. (2011), 'Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling', *Cell Res*, 21 (1), 103-15.
- Mullan, M. (1992), 'Familial Alzheimer's disease: second gene locus located', *BMJ*, 305 (6862), 1108-9.
- Murrell, J., et al. (1991), 'A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease', *Science*, 254 (5028), 97-9.
- Neddens, J., et al. (2018), 'Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol Commun*, 6 (1), 52.
- Nhan, H. S., Chiang, K., and Koo, E. H. (2015), 'The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes', *Acta Neuropathol*, 129 (1), 1-19.
- Nilsberth, C., et al. (2001), 'The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation', *Nat Neurosci*, 4 (9), 887-93.
- Noble, W., et al. (2013), 'The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases', *Front Neurol*, 4, 83.
- Noel, A., Barrier, L., and Ingrand, S. (2016), 'The Tyr216 phosphorylated form of GSK3beta contributes to tau phosphorylation at PHF-1 epitope in response to Abeta in the nucleus of SH-SY5Y cells', *Life Sci*, 158, 14-21.
- Oakley, H., et al. (2006), 'Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation', *J Neurosci*, 26 (40), 10129-40.
- Oddo, S., et al. (2008), 'Blocking Abeta42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting protein: a mechanistic link between Abeta and tau pathology', *J Neurosci*, 28 (47), 12163-75.
- Oddo, S., et al. (2003), 'Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction', *Neuron*, 39 (3), 409-21.

- Osborn, L., Kunkel, S., and Nabel, G. J. (1989), 'Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (7), 2336-40.
- Palop, J. J. and Mucke, L. (2009), 'Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease', *Arch Neurol*, 66 (4), 435-40.
- (2010), 'Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks', *Nat Neurosci*, 13 (7), 812-8.
- Palop, J. J., et al. (2007), 'Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease', *Neuron*, 55 (5), 697-711.
- Pardossi-Piquard, R., et al. (2005), 'Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP', *Neuron*, 46 (4), 541-54.
- Perluigi, M., et al. (2016), 'Aberrant protein phosphorylation in Alzheimer disease brain disturbs pro-survival and cell death pathways', *Biochim Biophys Acta*, 1862 (10), 1871-82.
- Pesce, A., et al. (2003), 'Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity', *Structure*, 11 (9), 1087-95.
- Petkova, A. T., et al. (2004), 'Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel beta-sheet registry in fibrils formed by a beta-amyloid peptide', *J Mol Biol*, 335 (1), 247-60.
- Piedrahita, D., et al. (2010), 'Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic alzheimer's mice', *J Neurosci*, 30 (42), 13966-76.
- Powell, S. R., et al. (2005), 'Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins', *Free Radic Biol Med*, 38 (8), 1093-101.
- Prangio, P., et al. (2012), 'Multivariate analyses of amyloid-beta oligomer populations indicate a connection between pore formation and cytotoxicity', *PLoS One*, 7 (10), e47261.
- Prox, J., et al. (2013), 'Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions', *J Neurosci*, 33 (32), 12915-28, 28a.
- Puzzo, D., et al. (2008), 'Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus', *J Neurosci*, 28 (53), 14537-45.
- Radde, R., et al. (2006), 'Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology', *EMBO Rep*, 7 (9), 940-6.
- Rall, W. (1962), 'Electrophysiology of a dendritic neuron model', *Biophys J*, 2 (2 Pt 2), 145-67.
- Rall, W. and Rinzel, J. (1973), 'Branch input resistance and steady attenuation for input to one branch of a dendritic neuron model', *Biophys J*, 13 (7), 648-87.
- Ransohoff, R. M. (2017), 'Specks of insight into Alzheimer's disease', *Nature*, 552 (7685), 342-43.
- Raychaudhuri, S., et al. (2010), 'Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death', *Apoptosis*, 15 (4), 401-11.
- Reinert, J., et al. (2014), 'Abeta38 in the brains of patients with sporadic and familial Alzheimer's disease and transgenic mouse models', *J Alzheimers Dis*, 39 (4), 871-81.
- Reuss, S., et al. (2002), 'Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues', *Neuroscience*, 115 (3), 645-56.
- Rice, H. C., et al. (2019), 'Secreted amyloid-beta precursor protein functions as a GABABR1a ligand to modulate synaptic transmission', *Science*, 363 (6423).

- Riepe, M. W. (2005), 'Cholinergic treatment: what are the early neuropathological targets?', *Eur J Neurol*, 12 Suppl 3, 3-9.
- Rogers, S. L. and Friedhoff, L. T. (1996), 'The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group', *Dementia*, 7 (6), 293-303.
- Ryan, N. S., et al. (2016), 'Clinical phenotype and genetic associations in autosomal dominant familial Alzheimer's disease: a case series', *Lancet Neurol*, 15 (13), 1326-35.
- Saito, T., et al. (2014), 'Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease', *Nat Neurosci*, 17 (5), 661-3.
- Saito, T., et al. (2011), 'Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43', *Nat Neurosci*, 14 (8), 1023-32.
- Salas, I. H., et al. (2018), 'Increased Insoluble Amyloid-beta Induces Negligible Cognitive Deficits in Old AppNL/NL Knock-In Mice', *J Alzheimers Dis*, 66 (2), 801-09.
- Sasaguri, H., et al. (2017), 'APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies', *EMBO J*, 36 (17), 2473-87.
- Sastre, M., et al. (2003), 'Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase', *J Neurosci*, 23 (30), 9796-804.
- Schmidt, M., et al. (2003), 'How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina', *J Biol Chem*, 278 (3), 1932-5.
- Schneider, I., et al. (2001), 'Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation', *J Biol Chem*, 276 (15), 11539-44.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991), 'Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1', *EMBO J*, 10 (8), 2247-58.
- Schwindinger, W. F. and Robishaw, J. D. (2001), 'Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation', *Oncogene*, 20 (13), 1653-60.
- Selkoe, D. J. and Hardy, J. (2016), 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years', *EMBO Mol Med*, 8 (6), 595-608.
- Serpente, M., et al. (2015), 'Transmembrane protein 106B gene (TMEM106B) variability and influence on progranulin plasma levels in patients with Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 43 (3), 757-61.
- Sevigny, J., et al. (2016), 'The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease', *Nature*, 537 (7618), 50-6.
- Sharman, M. J., et al. (2010), 'APOE genotype results in differential effects on the peripheral clearance of amyloid-beta42 in APOE knock-in and knock-out mice', *J Alzheimers Dis*, 21 (2), 403-9.
- Siskova, Z., et al. (2014), 'Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease', *Neuron*, 84 (5), 1023-33.
- Sleegers, K., Brouwers, N., and Van Broeckhoven, C. (2010), 'Role of progranulin as a biomarker for Alzheimer's disease', *Biomark Med*, 4 (1), 37-50.
- Sturchler-Pierrat, C., et al. (1997), 'Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (24), 13287-92.
- Suarez-Calvet, M., et al. (2014), 'Autosomal-dominant Alzheimer's disease mutations at the same codon of amyloid precursor protein differentially alter Abeta production', *J Neurochem*, 128 (2), 330-9.

- Sultana, R., et al. (2006), 'Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD', *Neurobiol Aging*, 27 (11), 1564-76.
- Sun, F., et al. (2013), 'Neuroglobin protein is upregulated in Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 36 (4), 659-63.
- Sun, Y., et al. (2005), 'Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain', *Neurobiol Aging*, 26 (2), 275-8.
- Swomley, A. M., et al. (2014), 'A $\beta$ , oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies', *Biochim Biophys Acta*, 1842 (8), 1248-57.
- Szymanski, M., et al. (2010), 'Neuroglobin and Alzheimer's dementia: genetic association and gene expression changes', *Neurobiol Aging*, 31 (11), 1835-42.
- Takuma, H., et al. (2004), 'Amyloid beta peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo', *J Neuropathol Exp Neurol*, 63 (3), 255-61.
- Terry, R. D., et al. (1991), 'Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment', *Ann Neurol*, 30 (4), 572-80.
- Thal, D. R., et al. (2002), 'Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD', *Neurology*, 58 (12), 1791-800.
- Tilstra, J. S., et al. (2011), 'NF-kappaB in Aging and Disease', *Aging Dis*, 2 (6), 449-65.
- Tomita, T. (2014), 'Molecular mechanism of intramembrane proteolysis by gamma-secretase', *J Biochem*, 156 (4), 195-201.
- Tramutola, A., et al. (2017), 'Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease', *Brain Res Bull*, 133, 88-96.
- Tsai, J., et al. (2004), 'Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches', *Nat Neurosci*, 7 (11), 1181-3.
- Vallone, B., et al. (2004), 'The structure of carbonmonoxy neuroglobin reveals a heme-sliding mechanism for control of ligand affinity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (50), 17351-6.
- Vassar, R., et al. (2014), 'Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects', *J Neurochem*, 130 (1), 4-28.
- Verghese, P. B., et al. (2013), 'ApoE influences amyloid-beta (A $\beta$ ) clearance despite minimal apoE/A $\beta$  association in physiological conditions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (19), E1807-16.
- Wakasugi, K., et al. (2004), 'Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein', *Biochem Biophys Res Commun*, 318 (2), 453-60.
- Walker, L. C. and Jucker, M. (2015), 'Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept', *Annu Rev Neurosci*, 38, 87-103.
- Walsh, D. M., et al. (2002), 'Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo', *Nature*, 416 (6880), 535-9.
- Wang, Q., et al. (2004), 'Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5', *J Neurosci*, 24 (13), 3370-8.
- Wang, X., et al. (2008), 'Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia', *Stroke*, 39 (6), 1869-74.
- Wang, Y. J., et al. (2017), 'Hemin protects against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis activation via neuroglobin in SH-SY5Y cells', *Neurochem Res*, 42 (8), 2208-17.

- Watanabe, S. and Wakasugi, K. (2008), 'Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity', *Biochem Biophys Res Commun*, 369 (2), 695-700.
- Watanabe, S., et al. (2012), 'Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection', *J Biol Chem*, 287 (36), 30128-38.
- Wei, W., et al. (2010), 'Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity', *Nat Neurosci*, 13 (2), 190-6.
- Weitzner, D. S., et al. (2015), 'Morris Water Maze Test: Optimization for Mouse Strain and Testing Environment', *J Vis Exp*, (100), e52706.
- Welander, H., et al. (2009), 'Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains', *J Neurochem*, 110 (2), 697-706.
- Whitehouse, P. J., et al. (1982), 'Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain', *Science*, 215 (4537), 1237-9.
- Wisniewski, T., et al. (1994), 'Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro', *Am J Pathol*, 145 (5), 1030-5.
- Wong, H. K., et al. (2013), 'De-repression of FOXO3a death axis by microRNA-132 and -212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease', *Hum Mol Genet*, 22 (15), 3077-92.
- Woodruff-Pak, D. S., et al. (2007), 'Preclinical investigation of the functional effects of memantine and memantine combined with galantamine or donepezil', *Neuropsychopharmacology*, 32 (6), 1284-94.
- Wystub, S., et al. (2004), 'Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements', *Cytogenet Genome Res*, 105 (1), 65-78.
- Wystub, S., et al. (2003), 'Localization of neuroglobin protein in the mouse brain', *Neurosci Lett*, 346 (1-2), 114-6.
- Yakovlev, A. G., et al. (2001), 'Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury', *J Neurosci*, 21 (19), 7439-46.
- Yamashita, T., et al. (2014), 'Ferric human neuroglobin scavenges superoxide to form oxy adduct', *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 62 (6), 613-5.
- Ye, S. Q., et al. (2009), 'Silencing neuroglobin enhances neuronal vulnerability to oxidative injury by down-regulating 14-3-3gamma', *Acta Pharmacol Sin*, 30 (7), 913-8.
- Yu, L., et al. (2009), 'Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer', *Biochemistry*, 48 (9), 1870-7.
- Zafarullah, M., et al. (2003), 'Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions', *Cell Mol Life Sci*, 60 (1), 6-20.
- Zhang, C. G., et al. (2001), '[Coding region cDNA sequence cloning of rat neuroglobin gene, its polymorphism feature and tissue expression profile analysis]', *Yi Chuan Xue Bao*, 28 (11), 997-1001.
- Zhang, Q., Lenardo, M. J., and Baltimore, D. (2017), '30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology', *Cell*, 168 (1-2), 37-57.
- Zhang, W., et al. (2011), 'Functional and sequence analysis of human neuroglobin gene promoter region', *Biochim Biophys Acta*, 1809 (4-6), 236-44.
- Zheng, H. and Koo, E. H. (2006), 'The amyloid precursor protein: beyond amyloid', *Mol Neurodegener*, 1, 5.
- Zheng, H., et al. (1995), 'beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity', *Cell*, 81 (4), 525-31.